

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt
Gastroenterologie und Stoffwechsel

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Mechanismen der GSK-3 β -vermittelten Regulation des onkogenen Transkriptionsfaktors NFATc2 im Pankreaskarzinom



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sandra Dobes

aus Ludwigsburg

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
05.05.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder

1. Korreferent: Prof. Dr. Uta-Maria Bauer

Für meine Familie und Björn

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS ADENOKARZINOM DES PANKREAS	1
1.2 DIE GLYKOGEN-SYNTASE-KINASE-3 β	3
1.2.1 Struktur und Funktion	3
1.2.2 Regulation der GSK-3-Aktivität.....	5
1.2.3 Die Bedeutung von GSK-3 β in gastrointestinalen Karzinomen.....	7
1.3 DER NUKLEÄRE FAKTOR AKTIVIERTER T-ZELLEN (NFAT)	10
1.3.1 Die Struktur der NFAT-Proteine	10
1.3.2 Der Ca ²⁺ /Calcineurin/NFAT-Signalweg	11
1.3.3 Die Rolle von NFAT in der Progression des Pankreas-karzinoms	14
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
3 MATERIAL UND METHODEN.....	17
3.1 LABORGERÄTE	17
3.2 MATERIALIEN	18
3.3 CHEMIKALIEN	19
3.4 STANDARDS	21
3.5 KITS	21
3.6 VEKTOREN UND KONSTRUKTE.....	21
3.7 ENZYME	22
3.8 OLIGONUKLEOTIDE	22
3.9 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
3.9.1 Methoden im Umgang mit DNA	24
3.9.2 Methoden im Umgang mit RNA	28
3.10 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	29
3.10.1 Kultivierung der Zelllinien.....	29
3.10.2 Auftauen von Zellen.....	30
3.10.3 Kryokonservierung von Zellen	31
3.10.4 Zellzahlbestimmung	31
3.10.5 Transfektion der Zelllinien	31
3.10.6 Herstellung und Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien	31
3.10.7 Luciferase-Reporterassay	32
3.10.8 Wachstumssays.....	32
3.11 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	33
3.11.1 Isolierung von Proteinen aus Zelllinien.....	33
3.11.2 Proteinbestimmung nach Bradford	35
3.11.3 Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	35
3.11.4 DNA-Pulldown	36
3.11.5 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.11.6 Western-Blot-Analyse.....	38
3.12 TIERVERSUCHE	40
3.13 IMMUNHISTOCHEMIE.....	40
3.14 IMMUNFLUORESZENZ.....	42
3.15 STATISTISCHE AUSWERTUNG	42

4	ERGEBNISSE	43
4.1	DIE PHARMAKOLOGISCHE GSK-3-HEMMUNG GEHT MIT EINEM VERMINDERTEN WACHSTUM VON PANKREASKARZINOMZELLEN IN VITRO UND IN VIVO EINHER	43
4.2	GSK-3 β BEEINFLUSST AKTIVITÄT UND EXPRESSION DES ONKOGENEN TRANSKRIPTIONSFAKTORS NFATc2 IM ZELLKERN	48
4.3	GSK-3 β PHOSPHORYLIERT DREI KONSERVIERTE SERINE IN DER SP2 REGION UND BEWAHRT NFATc2 SOMIT VOR EINEM RASCHEN PROTEINABBAU	58
4.4	DIE GSK-3 β -NFATc2-KOOPERATION VERSTÄRKT DIE PROLIFERATION VON PANKREASKARZINOMZELLEN IN VITRO UND IN VIVO	65
4.5	DIE KONSTITUTIVE SP2-PHOSPHORYLIERUNG IST NICHT AUSREICHEND FÜR DIE STABILISIERUNG DER GSK-3 β -ABHÄNGIGEN NFATc2-AKTIVITÄT	68
4.6	GSK-3 β STABILISIERT EINEN NFATc2-STAT3-TRANSKRIPTIONS-KOMPLEX IM ZELLKERN UND INDUZIERT DADURCH DIE NFATc2-AKTIVITÄT	70
4.7	GSK-3 β INDUZIERT DIE PROLIFERATION VON PANKREASKARZINOMZELLEN DURCH DIE SP2-ABHÄNGIGE STABILISIERUNG VON NFATc2 SOWIE DURCH EINE ÜBERGEORDNETE, STAT3-ABHÄNGIGE INDUKTION DER NFATc2-AKTIVITÄT	76
5	DISKUSSION	79
5.1	GSK-3 β FÖRdert DAS WACHSTUM VON PANKREASKARZINOM-ZELLEN IN VITRO UND IN VIVO	79
5.2	GSK-3 β VERMITTELT DIE WACHSTUMSFÖRDERNDEN EFFEKTE DURCH EINE ONKOGENE KOOPERATION MIT DEM TRANSKRIPTIONSFAKTOR NFATc2	81
5.3	GSK-3 β STABILISIERT DIE INTERAKTION VON NFATc2 MIT DEM ONKOGENEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR STAT3	83
5.4	CHANCEN UND RISIKEN DES EINSATZES VON GSK-3 β ALS ZIELMOLEKÜL IN DER TUMORTHERAPIE DES PANKREAS	90
5.5	SCHLUSSFOLGERUNG	92
6	LITERATURVERZEICHNIS	93
7	ANHANG	109
7.1	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	109
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	113
7.3	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	118
7.4	DANKSAGUNG	119

Zusammenfassung

GSK-3 β ist eine multifunktionelle Kinase, deren Deregulation mit mehreren Erkrankungen, wie z.B. Diabetes, Alzheimer oder Krebs assoziiert ist. Ursprünglich wurde ihr eine tumorhemmende Rolle aufgrund ihrer Beteiligung im Wnt- β -Catenin-Signalweg zugeschrieben. Neueste Erkenntnisse enthüllten jedoch eine entscheidende pro-proliferative Rolle im Pankreaskarzinom, welche mit einem aggressiven Phänotyp einhergeht. GSK-3 β ist überdies ein Hauptmodulator der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade. In T-Zellen vermittelt sie die Phosphorylierung von NFATc2 im Zellkern und leitet dadurch einen nukleären Export ein. Eigene Vorarbeiten konnten mehrere entscheidende, NFAT-vermittelte Mechanismen der Wachstumsstimulation im Pankreaskarzinom identifizieren. Über aktivierende bzw. hemmende Mechanismen des NFAT-Metabolismus im Tumor gibt es bisher nur unzureichende Erkenntnisse. Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche GSK-3 β -NFATc2-Interaktion im Pankreaskarzinom zu charakterisieren und den Einsatz von GSK-3 β -Inhibitoren zur spezifischen Hemmung von NFATc2 zu evaluieren. Hierbei konnte ein neuer, phosphorylierungsabhängiger GSK-3 β /NFATc2-Signalweg identifiziert werden, welcher wesentlich zum Wachstum von Pankreaskarzinomzellen beiträgt. Mechanistisch beobachteten wir, dass GSK-3 β drei konservierte Serine in der SP2-Region des NFATc2-Proteins phosphoryliert und dieses dadurch vor einem raschen Abbau im Zellkern bewahrt. Durch zielgerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Phosphorylierung der SP2-Region mit einem verstärkten Tumorstadium *in vitro* und *in vivo* einhergeht. Weiterhin konnten wir den onkogenen Transkriptionsfaktor STAT3 als NFATc2-Partnerprotein identifizieren und erstmals zeigen, dass GSK-3 β pSP2-unabhängig einen nukleären NFATc2-STAT3-Komplex rekrutiert und damit die Transaktivierung eines NFAT-responsiven Promotors verstärkt. Zusammenfassend wurde eine onkogene Rolle von GSK-3 β im Pankreaskarzinom charakterisiert, welche über die vielschichtige Regulation des onkogenen NFATc2-Transkriptionsfaktors vermittelt wird. Dabei wird einerseits die Stabilität des NFATc2-Proteins durch SP2-Phosphorylierung erhöht und andererseits wird die transkriptionelle Aktivität, unabhängig von der SP2-Phosphorylierung, durch Stabilisierung einer NFATc2-STAT3-Interaktion

induziert. Somit beschreibt diese Arbeit einen neuen onkogenen Signalweg und enthüllt neue Perspektiven für therapeutische Ansätze.

Summary

GSK-3 β is a multifunctional kinase which is deregulated in many diseases, such as diabetes, Alzheimers's disease or cancer. It was originally considered to be a tumor suppressor due to its implication in the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Recent studies however revealed a crucial pro-proliferative role in pancreatic cancer which is accompanied by an aggressive phenotype. GSK-3 β is moreover a main modulator of the Calcineurin/NFAT signaling pathway. Thereby, it serves to phosphorylate NFAT proteins in the nucleus in order to induce their nuclear export. Own previous works could identify several crucial NFATc2-mediated mechanisms of pancreatic tumor growth stimulation. However, there is rare evidence about upstream regulatory pathways targeting NFATc2 metabolism in cancer. The aim of this study was to assess a potential GSK-3 β -NFATc2 interaction in pancreatic cancer and to evaluate the use of GSK-3 β inhibitors to specifically target NFATc2. Herein, we identified a novel phosphorylation-dependent GSK-3 β -NFATc2 stabilization pathway which significantly contributes to pancreatic cancer growth. Mechanistically, we found that GSK-3 β phosphorylates three conserved serines in the SP2 region of NFATc2 and thereby preserves a rapid degradation in the nucleus. By site-directed mutagenesis, we could furthermore show that constitutive phosphorylation of NFATc2 accelerates tumor growth *in vitro* and *in vivo*. In addition, we identified STAT3 as a partner of NFATc2 and showed for the first time, that GSK-3 β stabilizes the interaction of NFATc2 with the oncogenic transcription factor and that this in turn enhances transcriptional activity on an NFAT-responsive promoter. Taken together this study reveals an oncogenic role of GSK-3 β in pancreatic cancer which is carried by a multi-faceted regulation of the transcription factor NFATc2. On the one hand, NFATc2 protein stability is strengthened by SP2 phosphorylation and on the other hand, transcriptional activity is stabilized independent of SP2 phosphorylation by recruiting a nuclear NFATc2-STAT3 complex. In summary, this novel oncogenic pathway provides further mechanistic insights into pancreatic cancer and opens new therapeutic prospects.

1 Einleitung

1.1 Das Adenokarzinom des Pankreas

Das Adenokarzinom des Pankreas (im Folgenden als Pankreaskarzinom bezeichnet) stellt die vierthäufigste Krebstodesursache dar und ist ursächlich für 6% aller Krebstodesfälle. Es ist mit einer schlechten Prognose assoziiert, wobei das mittlere Überleben bei vier Monaten liegt und nur etwa 3% der Patienten fünf Jahre überleben (Sakorafas *et al.*, 2000). Die bisher einzige kurative Therapiemöglichkeit ist die Resektion des Pankreas, zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wird die Erkrankung jedoch in weniger als 20% als kurativ resektierbar eingestuft (Rosewicz und Wiedenmann, 1997). Alternative Therapien sind meistens erfolglos, da das Pankreaskarzinom durch eine Resistenz gegenüber mehreren pro-apoptotischen Stimuli wie Chemotherapie oder Strahlung charakterisiert ist (Lionetto *et al.*, 1995). Nachdem eine Phase III-Studie in 1997 einen moderaten Vorteil gegenüber einer Behandlung mit 5-Fluorouracil aufdeckte, wurde Gemcitabine als Standard-Chemotherapeutikum für Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom eingesetzt (Burris *et al.*, 1997).

Die molekularen Mechanismen, die bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms eine Rolle spielen, sind noch unzureichend erforscht. Dem Pankreaskarzinom liegt eine mehrstufige Tumorzelltransformation zugrunde, die mit fortschreitenden histologischen Veränderungen des Epithels einhergeht, den pankreatisch-intraepitheliale Neoplasie (PanIN)-Läsionen 1-3 (Hruban *et al.*, 2001). Diese sind durch strukturelle und zelluläre Abnormalitäten charakterisiert, dabei können im Laufe dieser Tumorzelltransformation verschiedene Mutationen in Genen auftreten. Grundsätzlich bedingt eine Ansammlung von vererbten sowie erworbenen genetischen und epigenetischen Veränderungen die Tumorgenese. Dabei können meistens Abnormalitäten in drei Klassen von Genen nachgewiesen werden: Onkogene, Tumorsuppressorgene und sog. „*chromatin remodeling genes*“ (vermitteln Histonmethylierung und Histonacetylierung) (Xie *et al.*, 2006). Abbildung 1 fasst die häufigsten molekularen Abberationen des Pankreaskarzinoms zusammen. Dabei wird in 95% der Pankreaskarzinome eine Mutation im *K-Ras*-Gen gefunden, 69% besitzen eine Mutation im epidermalen Wachstumsfaktor-

Rezeptor (*EGFR*)-Gen und 59% tragen eine aktivierende *Akt*-Mutation (Wong und Lemoine, 2009). Des Weiteren werden Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF), EGF, „*transforming growth factors* α und β ($TGF\alpha$, $TGF\beta$) sowie ihre Rezeptoren überexprimiert (Sakorafas *et al.*, 2000). Schließlich sind abberante Veränderungen in molekularen Zellsignalwegen möglich.

Die Identifikation neuer Zielmoleküle für Therapieansätze und für die Diagnose ist von großer Bedeutung. Gezielte Therapien sollen dabei Zellsignalwege beeinflussen, die essentiell für das Überleben des Tumors, nicht jedoch für gesunde Zellen sind. Ferner können diese Therapien in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt werden, um deren Effektivität zu steigern und die Chemoresistenz zu vermindern.

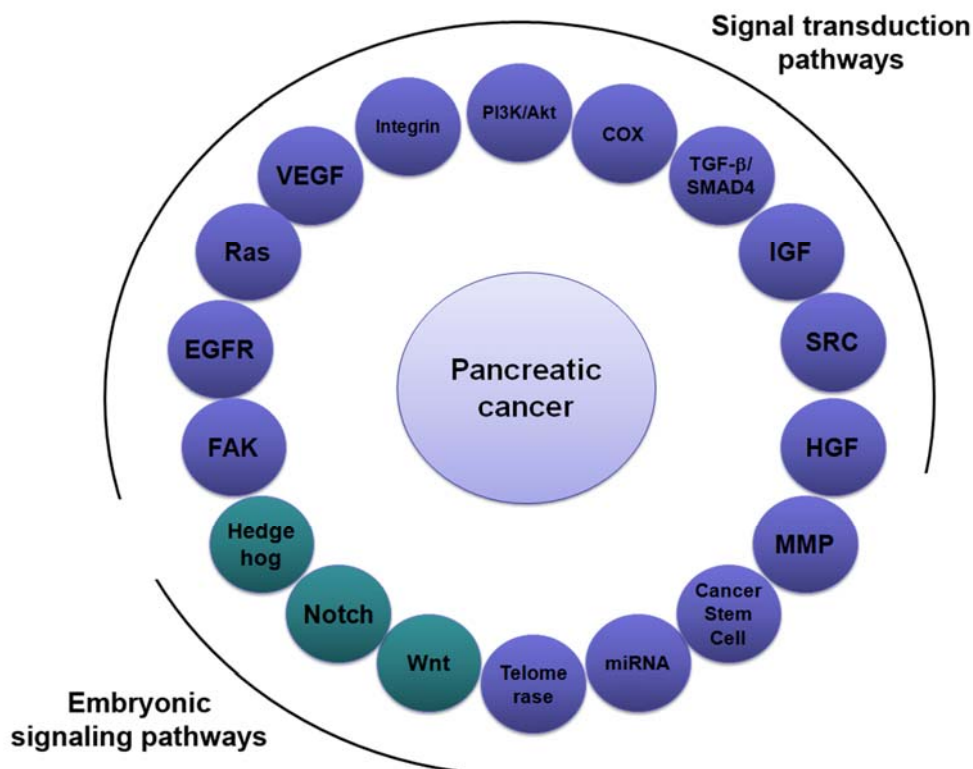


Abbildung 1: Die komplexen und miteinander verbundenen Zellsignalwege, die an der Pankreaskarzinogenese beteiligt sind (nach Wong und Lemoine, 2009). Die Einheiten erfüllen verschiedene Rollen in der Progression des Tumorwachstums, Apoptoseresistenz, Invasion, Metastasierung, und Angiogenese. Die Reaktivierung von physiologischen, embryonalen Entwicklungsvorgängen wird im Pankreaskarzinom auch häufig beobachtet. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) regulieren Tumordinvasion und Neovaskularisierung. Die Telomerase dient der Erhaltung der Telomere und ist in den meisten Pankreaskarzinomen aktiviert. Die microRNAs (miRNAs) regulieren die post-transkriptionelle Genexpression und können entweder onkogen oder tumorhemmend wirken. Tumorstammzellen sind mit

Tumorprogression, Resistenz gegen Chemotherapie und Bestrahlung sowie mit Wiederauftreten der Erkrankung assoziiert. Abk: VEGF, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; COX, Cyclooxygenase; TGF- β , *transforming growth factor* β ; IGF, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor; HGF, Hepatozyten Wachstumsfaktor; FAK, fokale Adhäsionskinase; EGFR, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor.

1.2 Die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β

1.2.1 Struktur und Funktion

Viele der im Pankreaskarzinom deregulierten Signaltransduktionswege (Ras, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt, EGFR, IGF) münden in der Regulation der Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3). GSK-3 ist eine multifunktionelle Serin/Threonin-Kinase, die kürzlich das Interesse als therapeutisches Zielmolekül in der Tumorbehandlung erlangt hat. Ursprünglich wurde sie aus quergestreifter Muskulatur isoliert und aufgrund ihrer bedeutenden Funktion als Schlüsselenzym im Glykogenmetabolismus und Insulinsignalweg identifiziert (Embi *et al.*, 1980; Woodgett *et al.*, 1984; Frame und Cohen, 2001). Durch ihre hohe Anzahl an Substraten (bisher sind mehr als 50 Proteine und 10 Transkriptionsfaktoren bekannt; Abb. 2) moduliert sie diverse Zellsignalwege wie z.B. die Regulation des Zellschicksals während der Embryonalentwicklung, Proteinsynthese und -stabilität, Glykogenmetabolismus, Zellmobilität, Neuronalfunktion, Karzinogenese sowie Zellproliferation und -überleben (Eldar-Finkelman, 2002; Jope and Johnson, 2004). So ist die Deregulation der GSK-3 β -Aktivität oder ihrer vorgeschalteten Signalwege in unzählige Erkrankungen wie Diabetes, neurodegenerative Erkrankungen, bipolare Störungen, Alzheimer und Tumorerkrankungen involviert (Martinez, 2008).

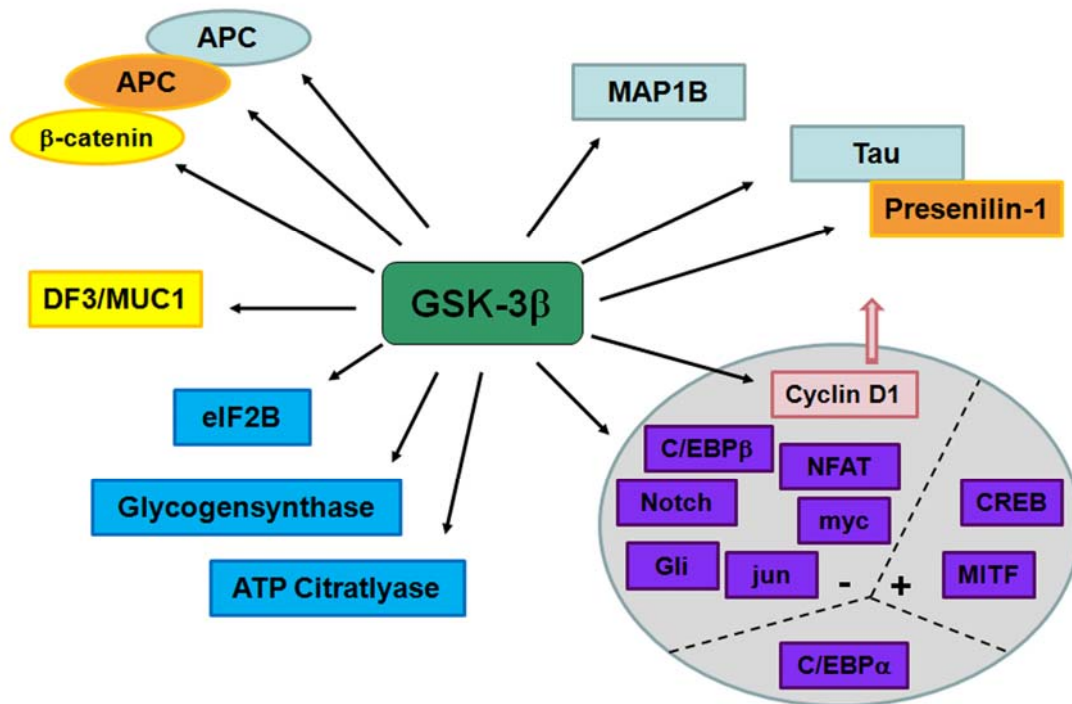


Abbildung 2: GSK-3-Substrate (Doble und Woodgett, 2003). Die potentiellen Substrate sind abhängig von ihren zellulären Funktionen mit Farben gekennzeichnet: Transkriptionsfaktoren (violett), metabolische Enzyme (blau), Microtubuli-assoziierte Proteine (hellblau), Strukturproteine (orange) und Mitglieder der Zellzyklusmaschinerie (pink) bzw. Adhäsionsproteine (gelb). Die Transkriptionsfaktoren sind weiterhin unterteilt in solche, die durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) inhibiert (-), aktiviert (+) oder nach der Phosphorylierung gar nicht beeinflusst werden. Der Komplex aus Axin, „*adenomatous polyposis coli*“ (APC) und β -Catenin (Ellipsen) ist essentiell für die Regulation der Embryogenese. Die Phosphorylierung von Cyclin D1 erfolgt vermutlich im Zellkern und leitet den nukleären Export und die Degradation ein. Presenilin-1 ist ein Strukturprotein, welches die Tau-Phosphorylierung durch GSK-3 erleichtert.

GSK-3 besteht aus zwei Isoformen, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden: GSK-3 α (51kD) und GSK-3 β (48kDa). Die Isoformen sind hochkonserviert und besitzen 98% Sequenzidentität in ihrem katalytischen Zentrum. Sie unterscheiden sich allerdings in ihren letzten 76 C-terminalen Aminosäuren (Woodgett, 1990). Die Abbildung 3 illustriert die Struktur der GSK-3-Isoformen. Der embryonal-letale Phänotyp von GSK-3 β -knockout-Mäusen kann durch die Anwesenheit von GSK-3 α nicht antagonisiert werden, daher sind beide Isoformen vermutlich funktionell nicht redundant (Hoeflich *et al.*, 2000). In embryonischen Stammzellen der Maus, die entweder nur GSK-3 α oder GSK-3 β exprimieren, findet zudem keine kompensatorische Heraufregulation der entsprechenden Proteinexpression oder Aktivität statt (Doble *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist wenig über Isoform-spezifische Funktionen bekannt, wobei

die Untersuchungen und Erkenntnisse zur GSK-3 β deutlich überwiegen. Jüngste Studien entdeckten eine Spleißvariante von GSK-3 β (GSK-3 β 2), welche zusätzliche 13 Aminosäuren in der Kinaseregion enthält (Mukai *et al.*, 2002).

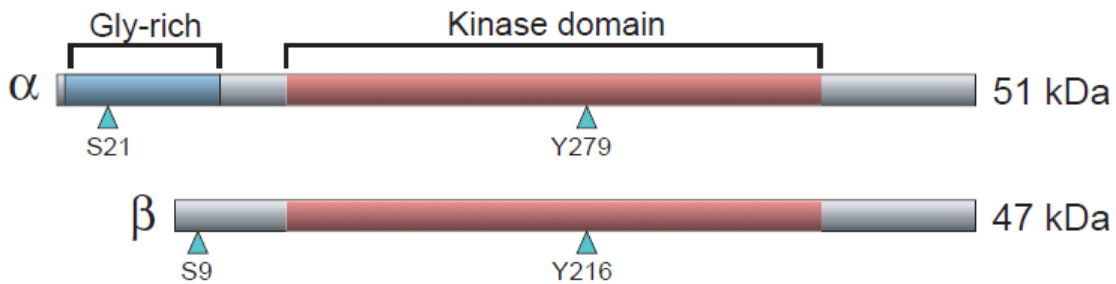


Abbildung 3: Schematische Darstellung der GSK- α und GSK-3 β -Isoformen aus Säugetieren (Doble und Woodgett, 2003). Die Serin- und Tyrosinphosphorylierungsstellen sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. Die α -Isoform ist durch eine Glycin-reiche Region (blau) gekennzeichnet. Beide Isoformen enthalten die Kinasedomäne, welche rot hervorgehoben ist.

1.2.2 Regulation der GSK-3-Aktivität

Da GSK-3 β offensichtlich eine bedeutende Funktion in mehreren zellulären Prozessen erfüllt, ist eine präzise und situationsabhängige Regulation der Kinaseaktivität notwendig. Im Gegensatz zu anderen Kinasen ist GSK-3 β in ruhenden Zellen konstitutiv aktiv und kann durch verschiedene Stimuli rasch gehemmt werden. Zwei wichtige Kontrollmechanismen sind einerseits die regulatorische Phosphorylierung von GSK-3 β selbst durch vorgeschaltete Signalwege und andererseits die Vorphosphorylierung („*Priming*“) der Substrate durch nachgeschaltete Mechanismen. Die Phosphorylierung eines N-terminalen Serins (Ser9) vermindert die GSK-3 β -Aktivität signifikant. Der PI3K/Akt-Zellsignalweg, der nach Stimulation mit Insulin und anderen Wachstumsfaktoren aktiviert wird, zählt zu den Hauptregulatoren der GSK-3 β -Aktivität (Grimes und Jope, 2001). Auch die Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) regulieren die GSK-3 β -Aktivität durch Ser9-Phosphorylierung (Fang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Tanji *et al.*, 2002; Ballou *et al.*, 2001). Je nach subzellulärer Verteilung von GSK-3 β und der regulierenden Kinase kann jedoch nur ein bestimmter Anteil von GSK-3 β phosphoryliert werden (Jope und

Johnson, 2004). Die Phosphorylierung von Tyr216 durch Autophosphorylierung, Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration oder durch Kinasen hingegen steigert die GSK-3 β -Aktivität (Hartigan und Johnson, 1999; Doble und Woodgett, 2003). Abb. 4 fasst abschließend die bekannten phosphorylierungsabhängigen Kontrollmechanismen zusammen. Weiterhin müssen viele Substrate (z.B. Glykogensynthase (GS)) etwa 4 Aminosäuren nach der eigentlichen GSK-3 β -Phosphorylierungsstelle durch andere Kinasen (z.B. „*cyclin-dependent kinase 5*“ (CDK5), Caseinkinase 2 (CK2), PKA) vorphosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von nicht vorphosphorylierten Substraten wie Cyclin D3, Axin, „*adenomatous polyposis coli*“ (APC) oder β -Catenin erfolgt dahingegen weniger effizient (Frame *et al.*, 2001). Andere regulatorische Mechanismen zur Kontrolle der GSK-3 β -Aktivität sind die Regulation der subzellulären Lokalisation sowie Protein-Protein-Interaktionen (Frame und Cohen, 2001). Kürzlich konnte zwar eine nukleäre Lokalisationssequenz im GSK-3 β -Protein identifiziert werden, trotzdem bleibt der Mechanismus, der den „*shuttle*“ zwischen Zellkern und Cytoplasma reguliert, ungeklärt (Meares und Jope, 2007). Durch die Bindung an Proteinkomplexe kann die GSK-3 β -Aktivität hinsichtlich spezifischer Substrate weiterhin verstärkt oder gehemmt werden (Frame und Cohen, 2001).

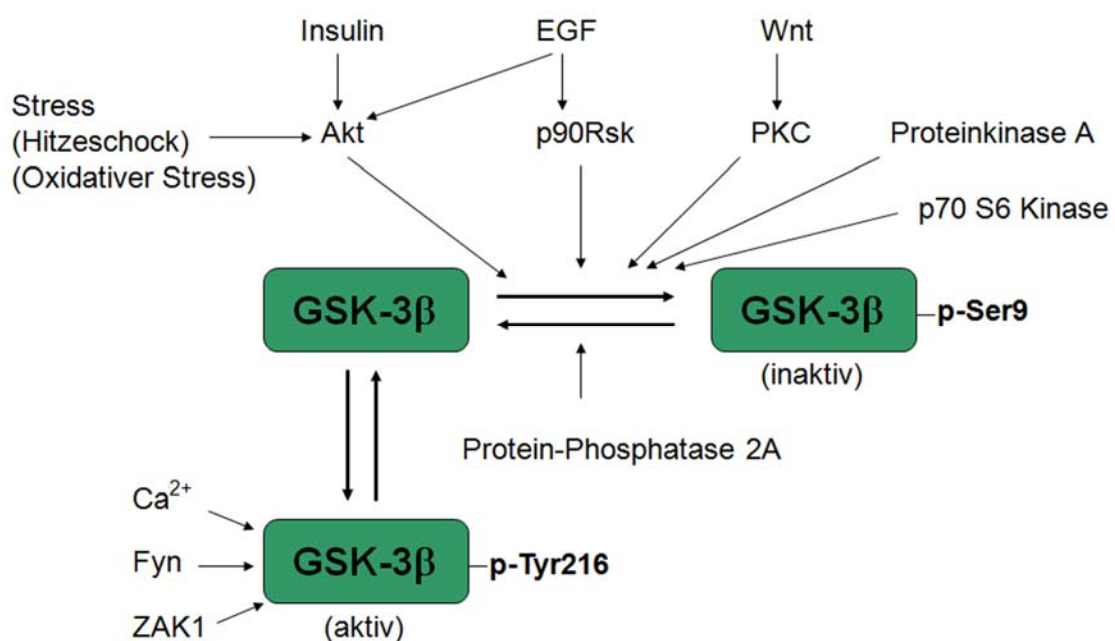


Abbildung 4: Regulation der GSK-3 β -Aktivität (nach Grimes und Jope, 2001). Die wichtigsten Signale, welche die GSK-3 β -Aktivierung über die Tyr216-Phosphorylierung sowie die Inaktivierung über die Ser9-Phosphorylierung vermitteln, sind dargestellt. Abk. EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; PKC, Proteinkinase C; p90Rsk, *p90 ribosomal S6 kinase*; ZAK1, *zaphod kinase-1*.

1.2.3 Die Bedeutung von GSK-3 β in gastrointestinalen Karzinomen

Aufgrund der negativen Regulation vieler Proto-Onkogene und Zellzyklusregulatoren galt GSK-3 β bisher als Tumorsuppressor. Diese Sicht wird durch zahlreiche Studien bekräftigt und die dahinter stehenden Mechanismen sind vielzählig. GSK-3 β ist ein wichtiger Suppressor der Wnt-, Hedgehog- und Notch-Zellsignalwege, welche Zellschicksal und Stammzellerhaltung modulieren. Hierbei phosphoryliert GSK-3 β die Proto-Onkogene β -Catenin, Cyclin D1, Gli, c-myc und c-jun und markiert diese für den proteosomalen Abbau. Diese Signalwege sind in Tumoren häufig mutiert und darüber hinaus wurden einige „*gain-of-function*“ Mutationen von den genannten GSK-3 β -Substraten in Haut-, Kolon-, Prostata- und Lebertumoren gefunden (Polakis, 2007). Zudem ist eine deregulierte GSK-3 β -Aktivität im Zusammenhang mit Ösophagus- oder Brustkarzinomen sowie Hauttumoren bekannt. Überwiegend ist eine dramatisch erhöhte Ser9-Phosphorylierung oder eine signifikant reduzierte Tyr216-Phosphorylierung sowie eine generell herabgesetzte Expression von GSK-3 β in Mausmodellen, Tumorgeweben oder Zellkulturmodellen beschrieben (s. Tab. 1 Übersicht in: Luo, 2009). Andererseits konnten neueste Studien eine essentielle Rolle in der Tumorprogression demonstrieren und weckten somit das Interesse für GSK-3 β als Zielmolekül in der Tumorthherapie. Dabei stammt einer der ersten Hinweise aus Studien an Mäusen mit homozygoter Deletion von GSK-3 β . Diese weisen einen embryonal-letalen Phänotyp aufgrund einer Hepatozytendegeneration auf. Aus diesen Mäusen isolierte embryonale Fibroblasten sind anfälliger für eine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-induzierte Apoptose (Hoeflich *et al.*, 2000). Überdies enthüllten Analysen des Phosphorylierungsstatus, der Aktivität und Funktion in mehreren gastrointestinalen Karzinomen eine pathologische Bedeutung von GSK-3 β (Shakoori *et al.*, 2005; Mai *et al.*, 2006). Dies ist für Tumoren des Pankreas, Kolons, Magens, Ösophagus und der Leber beschrieben (s. Tab. 1). Dabei wurde eine hohe Expression von aktiver GSK-3 β

in Magen-, Kolon-, Pankreas- und Leberkarzinomzelllinien sowie in manchen Primärtumoren im Vergleich zu den jeweiligen nicht-neoplastischen Geweben demonstriert (Ougolkov und Billadeau, 2006; Mai *et al.*, 2009). Die Hemmung mit „*small molecule inhibitors*“ oder durch RNA-Interferenz (RNAi) verzögert die Proliferation und induziert Apoptose in den oben genannten gastrointestinalen Karzinomzellen, nicht jedoch in humanen embryonale Nierenzellen (HEK293), Brustepithelzellen sowie humanen oder murinen embryonalen Lungenfibroblasten (Shakoori *et al.*, 2005; Ougolkov *et al.*, 2005 und 2006; Mai *et al.*, 2006 und 2009). Abgesehen von den gastrointestinalen Tumoren sind pro-proliferative Funktionen in weiteren Tumorgeweben wie z.B. im Ovarialkarzinom (Cao *et al.*, 2006), Gliom und Glioblastom (Kotliarova *et al.*, 2008; Miyashita *et al.*, 2009), Schilddrüsenkarzinom (Kunnimalaiyaan *et al.*, 2007), Prostatakarzinom (Mazor *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2010), Nierenzellkarzinom (Bilim *et al.*, 2009), Blasenkarzinom (Naito *et al.*, 2010) und MLL Leukämie (Patel und Woodgett, 2008) identifiziert worden. Im Wesentlichen verzögert die pharmakologische Hemmung von GSK-3 β das Tumorwachstum in etablierten Kolon- und Pankreas-Xenograftmodellen (Gosh und Altieri, 2005; Ougolkov *et al.*, 2006; Shakoori *et al.*, 2007; Mai *et al.*, 2009). GSK-3 β reguliert Tumorzellproliferation und -überleben sowie die Chemoresistenz vermutlich durch ein Netzwerk zahlreicher und miteinander verbundener Mechanismen. So erhält GSK-3 β die Aktivierung des nukleären Faktors- κ B (NF- κ B) aufrecht und fördert durch die Induktion der NF- κ B-Zielgene das Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo* (Hoefflich *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2004; Ougolkov *et al.*, 2005; Wilson und Baldwin, 2008). Weiterhin wurde eine GSK-3 β -vermittelte Regulation von p53, c-myc, der humanen Telomerase reversen Transkriptase (hTERT) sowie des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NFAT) beschrieben (Kulikov *et al.*, 2005; Kotliarova *et al.*, 2008; Bilsland *et al.*, 2009; Mai *et al.*, 2009; Yoeli-Lerner *et al.*, 2009). Die dahinter stehenden Mechanismen bleiben jedoch weitgehend ungeklärt. Tabelle 1 fasst bisher veröffentlichte Arbeiten über die duale Rolle von GSK-3 β in gastrointestinalen Tumoren zusammen.

Tabelle 1: Übersicht über die duale Rolle von GSK-3 β in gastrointestinalen Karzinomen (modifiziert nach Mishra, 2010)

<u>Tumorart</u>	<u>Erklärung für tumorhemmende Rolle</u>
Ösophaguskarzinom	Erhöhte pGSK-3 β -Expression (Kang <i>et al.</i> , 2008)
<u>Tumorart</u>	<u>Erklärung für tumorfördernde Rolle</u>
Pankreaskarzinom	<p>Die pharmakologische Hemmung verzögert Überleben/Proliferation und induziert Apoptose (Garcea <i>et al.</i>, 20047; Mamaghani <i>et al.</i>, 2009; Mai <i>et al.</i>, 2006)</p> <p>Aktive GSK-3β fördert das Tumorstadium (Ougolkov <i>et al.</i>, 2005)</p> <p>Hohe Expression und Aktivität sowie nukleäre Akkumulation, assoziiert mit Kinaseaktivität und Tumorentdifferenzierung (Ougolkov <i>et al.</i>, 2006; Ougolkov und Billadeau, 2006; Kang <i>et al.</i>, 2008)</p>
Kolorektales Karzinom	<p>Die pharmakologische Hemmung geht mit Zellzyklusarrest sowie Apoptoseinduktion einher (Ghosh und Altieri, 2005; Shakoori <i>et al.</i>, 2005 und 2007; Mai <i>et al.</i>, 2006)</p> <p>Hohe Expression und Aktivität in Tumoren (Kang <i>et al.</i>, 2008; Shakoori <i>et al.</i>, 2005 und 2007)</p>
Leberkarzinom	<p>Geringe pGSK-3β-Expression (Kang <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>Hohe Expression und Aktivität (Mai <i>et al.</i>, 2006)</p> <p>Pharmakologische Hemmung geht mit Apoptoseinduktion einher (Beurel <i>et al.</i>, 2009)</p>
Magenkarzinom	<p>Geringe pGSK-3β-Expression in Tumoren (Kang <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>Pharmakologische Hemmung verzögert Überleben/Proliferation und induziert Apoptose (Mai <i>et al.</i>, 2006)</p>
Ösophagus	Hemmung der Kinaseaktivität mit Lithium führt zum Proliferationsarrest (Wang <i>et al.</i> , 2008)

1.3 Der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT)

1.3.1 Die Struktur der NFAT-Proteine

GSK-3 β ist ein wichtiger Modulator der Calcineurin/NFAT-Signaltransduktionskaskade. NFAT wurde ursprünglich in nukleären Extrakten aktivierter T-Zellen als induzierbarer Faktor beschrieben, der an den Interleukin-2 (IL-2)-Promotor bindet (Shaw *et al.*, 1988). Die NFAT-Familie der Transkriptionsfaktoren umfasst fünf Mitglieder, welche mit der REL-Familie der Transkriptionsfaktoren (NF- κ B-Familie) verwandt sind: NFAT1 (auch als NFATc2 oder NFATp bekannt), NFAT2 (auch bekannt als NFATc1 oder NFATc), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3 oder NFATx) und NFAT5 („*tonicity element binding protein*“; TonEBP) (Gräf *et al.*, 2001). Nachfolgend sollen die Merkmale von NFATc1-c4 (im Folgenden „NFAT“ genannt) näher beschrieben werden. NFAT wird ubiquitinär exprimiert, zudem existieren Spleißvarianten von jeder Isoform, welche sich in ihren N- und C-Termini unterscheiden (Imamura *et al.*, 1998; Chuvpilo *et al.*, 1999). Die Struktur der NFAT-Proteine ist in Abbildung 5 dargestellt. Sie umfasst eine regulatorische Domäne (auch: NFAT-homologe Region (NHR)), eine hoch konservierte DNA-Bindungsdomäne (auch: Rel-homologe Domäne (RHD)) und eine Carboxy-terminale Domäne. Die NHR, eine konservierte Region mit einer Länge von etwa 300 Aminosäuren ist in ruhenden Zellen stark phosphoryliert. Die Phosphorylierung wird dabei von den NFAT-Kinasen Caseinkinase I (CK1), GSK-3 und „*dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated-kinase*“ (DYRK) vermittelt (Okamura *et al.*, 2004; Beals *et al.*, 1997; Gwack *et al.*, 2006). Die NHR enthält weiterhin Bindungsstellen für Calcineurin und CK1, welche die NFAT-Aktivierung über den Phosphorylierungsstatus der SRR1-Region reguliert. Zudem enthält sie eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die Promoterelemente bindet und die Gentranskription induziert (Hogan *et al.*, 2003; Crabtree und Schreiber, 2009).

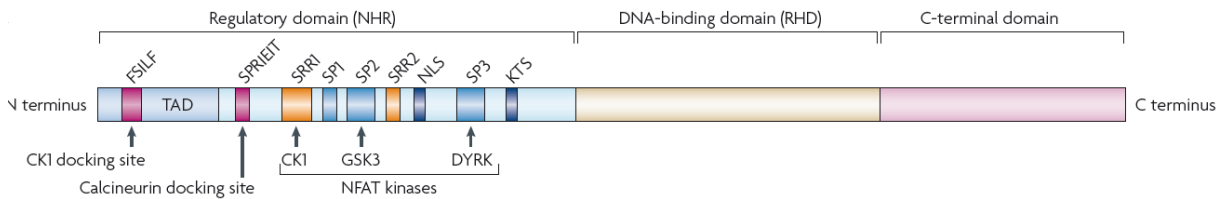


Abbildung 5: Primärstruktur von NFAT-Transkriptionsfaktoren (Müller und Rao, 2010). Die NFAT-Proteine bestehen aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne (auch NFAT-homologe Region (NHR)), einer DNA-Bindungsdomäne (auch REL-homologe Domäne (RHD)) und einer C-terminalen Domäne. Die regulatorische Domäne enthält eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) und eine Andockstelle für Caseinkinase 1 (CK1), als FSILF bezeichnet, und für Calcineurin, SPRIET benannt. Sie enthält weiterhin zahlreiche serinreiche Motive (SRR1, SP1, SP2, SRR2, SP3 und KTS) sowie eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS).

1.3.2 Der Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-Signalweg

NFATc1-c4 werden durch den intrazellulären Ca^{2+} /Calcineurin-Signalweg reguliert (Macian, 2005), NFAT5 wird aufgrund der fehlenden Calcineurin-Bindungsstelle nicht durch Calcineurin stimuliert, sondern auf osmotischen Stress hin (Miyakawa *et al.*, 1999; Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999). Der Mechanismus der NFAT-Aktivierung wurde zwar weitgehend aus Studien in Immunzellen abgeleitet, jedoch konnte dieser in anderen Geweben, wie z.B. Herzmuskel, Skelettmuskel, Knochen oder Tumoren, bestätigt werden (Crabtree und Olson, 2002; Schulz und Yutzey, 2004; Macian, 2005; Sitara und Aliprantis, 2010; Buchholz *et al.*, 2006). Der Calcineurin/NFAT-Signalweg ist vereinfacht in Abb. 6 dargestellt. Im Ruhezustand befinden sich NFAT-Proteine in einem stark phosphorylierten und damit inaktiven Zustand im Cytoplasma. Mehr als 20 unterschiedliche Phosphorylierungsstellen wurden für NFATc2 identifiziert, 18 davon befinden sich in der regulatorischen Domäne (Okamura *et al.*, 2000). Diese liegen in folgenden serinreichen Sequenzen vor: serinreiche Region (SRR-1) und Serin-Prolin-XX (SPXX, wobei XX eine beliebige Aminosäure beschreibt) Motive SP1, SP2 und SP3. Die Aktivierung der NFAT-Proteine erfolgt nach einem Calciuminflux durch spezialisierte „ Ca^{2+} release activated channels“ (CRAC). CRACs erhalten das Ca^{2+} -Signal aufrecht und sind für die effiziente Aktivierung der Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin essentiell (Okamura *et al.*, 2000; Hogan *et al.*, 2003; König *et al.*, 2010b). Die darauffolgende Dephosphorylierung der SP-Motive enthüllt ein nukleäres Lokalisationssignal und verdeckt eine nukleäre Exportsequenz. Infolgedessen wird die Translokation in den Zellkern und die transkriptionelle Aktivität induziert

(Okamura *et al.*, 2000). NFAT bindet dabei an die Konsensussequenz GGAAA der Zielpromotorelemente und interagiert entweder als Homodimer, Heterodimer oder durch die Interaktion mit Ko-Faktoren mit der DNA (Rao *et al.*, 2007; Gräf *et al.*, 2001). Die Kooperation mit verschiedenen Partnerproteinen ist für eine effiziente DNA-Bindung essentiell. Abhängig von Zelltyp und Art der Stimulation wird dabei die Transkription spezifischer Gene eingeleitet und aufrechterhalten (Hogan *et al.*, 2003; Macian, 2005; Crabtree und Schreiber, 2009). NFAT-Proteine können überdies in Zusammenspiel mit spezifischen Partnern die lokale Chromatinacetylierung verstärken, und damit Zielpromotoren aktivieren, oder mit Histondeacetylasen interagieren, um Zielgene stillzulegen (Choo *et al.*, 2009; König *et al.*, 2010a). Der effiziente nukleäre Export ($T_{1/2} \approx 15$ min) hingegen geht mit der Beendigung der transkriptionellen Aktivität einher. Die Akkumulation von NFAT im Cytoplasma wird durch mehrere redundante Mechanismen, wie z.B. die intrinsische Hemmung der Calcineurinaktivität, pharmakologische Calcineurininhibitoren wie z.B. FK506 und Cyclosporin A (CsA), verringerte Ca^{2+} -Konzentrationen oder nukleäre Kinasen, bewirkt (Rao *et al.*, 1997; Horsley und Pavlath, 2002). Zahlreiche Serin/Threonin-Kinasen wurden als Modulatoren der NFAT-Aktivität identifiziert und charakterisiert. Diese können in Erhaltungs- und Exportkinasen eingeteilt werden, welche entweder den phosphorylierten Zustand von NFAT im Cytoplasma aufrechterhalten oder den Export aus dem Zellkern fördern. So stellt GSK-3 eine NFAT-Exportkinase dar, welche das SP2-Motiv von NFATc2 sowie SP2- und SP3-Motive von NFATc1 phosphoryliert. Jedoch erfordert dies eine Vorphosphorylierung durch die „*priming*“ Kinasen PKA oder DYRK (Beals *et al.*, 2000; Neal und Clipstone, 2000; Okamura *et al.*, 2004; Gwack *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2007). CK1 dient als Erhaltungs- und Exportkinase und phosphoryliert die SRR-1-Region (Okamura *et al.*, 2004). Weiterhin wurde kürzlich eine neue Klasse von Erhaltungs- und Exportkinasen, die DYRKs, in einem „*small interfering RNA screen*“ in *Drosophila melanogaster* identifiziert. DYRK1 und DYRK2 phosphorylieren die SP3-Region und „*primen*“ dabei die SRR-1-, bzw. SP2-Phosphorylierung durch CK1, bzw. GSK-3 (Gwack *et al.*, 2006; Arron *et al.*, 2006). Zusammenfassend regulieren mehrere Kinasen die präzise subzelluläre Lokalisation und folglich die Aktivität der NFAT-Proteine.

Daher könnte die Identifikation von solchen Kinasen, die häufig in Tumoren dereguliert sind, einen Ansatz für therapeutisches „*Targeting*“ liefern.

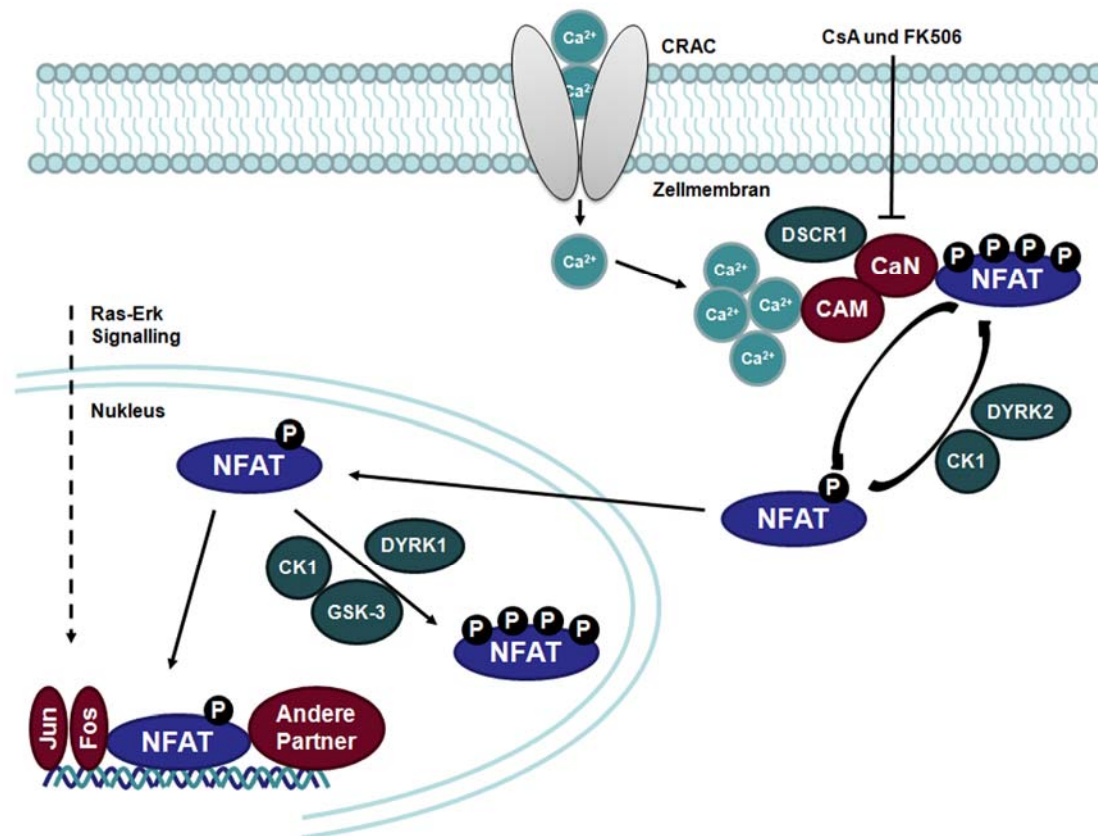


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Calcineurin/NFAT-Signalweges (modifiziert nach Mancini und Toker, 2010). Nach Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen werden „*Ca²⁺ release-activated channels*“ (CRAC) geöffnet, welche den Ca^{2+} -Influx aufrechterhalten. Calmodulin (CAM) bindet Ca^{2+} und daraufhin die Phosphatase Calcineurin (CaN), welche im Gegenzug den nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) im Cytoplasma dephosphoryliert. Inaktive NFAT-Proteine sind grundsätzlich hyperphosphoryliert, deren Dephosphorylierung hingegen leitet die nukleäre Translokation sowie Gentranskription ein. NFATs kooperieren mit zahlreichen Partnerproteinen, wie z.B. mit dem Aktivatorprotein 1 (AP1)-Komplex (Fos-Jun-Dimere). Der NFAT „turnover“ wird über komplexe Mechanismen durch Erhaltungskinasen (Caseinkinase 1 (CK1), „*dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2*“ (DYRK2)), welche hyperphosphoryliertes NFAT im Cytoplasma zurückhalten, sowie durch nukleäre Exportkinasen (CK1, DYRK1, Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3)) moduliert. Weiterhin gibt es intrinsische negative Regulatoren von Calcineurin wie z.B. „*Down syndrome candidate region 1*“ (DSCR1). Pharmakologische Antagonisten von Calcineurin wie Cyclosporin A (CsA) und FK506 sind starke Inhibitoren der NFAT-Dephosphorylierung und nukleärer Akkumulation. P = Phosphorylierung.

1.3.3 Die Rolle von NFAT in der Progression des Pankreaskarzinoms

Zahlreiche Studien deckten auf, dass der NFAT-Signalweg nicht nur in Immunzellen von Bedeutung ist. Vielmehr werden Zielgene reguliert, welche in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen von verschiedenen Zellen und Geweben beteiligt sind (Horsley und Pavlath, 2002). Hierbei unterliegen Myogenese, Chondrozytendifferenzierung und Entwicklung des kardio-vaskulären Systems teilweise der Regulation durch NFAT-Proteine (Chang *et al.*, 2004; Friday *et al.*, 2000; Gräf *et al.*, 2001 und 2003). Zudem tragen NFATc1 und NFATc2 zu mehreren Aspekten des Tumorphänotyps bei (Jauliac *et al.*, 2002; Mancini und Toker, 2009). Hierbei deuten einige Studien auf gegensätzliche Funktionen von NFATc1 und NFATc2 in der Karzinogenese hin. So können die Isoformen einerseits redundante Rollen erfüllen und andererseits beschreiben manche Arbeiten eine starke onkogene Funktion von NFATc1, wohingegen NFATc2 tumorhemmende Eigenschaften zugeschrieben werden (Robbs *et al.*, 2008). Holzmann *et al.* (2004) konnten dahingegen mittels genomischer DNA-Chip-Hybridisierung zeigen, dass NFATc2 in der Mehrheit der Pankreaskarzinome chromosomal amplifiziert ist. Eine chromosomale Reorganisation ist z.B. die Ursache einer EWSR1 und NFATc2 Fusion in manchen Ewing-Sarkomen, dem häufigsten und hochaggressiven Knochensarkom in der Kindheit. Dabei kommt es zu einer „*in-frame*“ Fusion der Transaktivierungsdomäne von ESWR1 mit der DNA-Bindungsdomäne von NFATc2, wodurch NFATc2 seine Zielpromotoren reguliert (Szuhai *et al.*, 2009). Des Weiteren wird in mehreren epithelialen und nicht-epithelialen Tumoren, darunter im Pankreaskarzinom, eine Überexpression und konstitutive Aktivierung von NFATc1 und NFATc2 beschrieben, welche mit einem hoch malignen und aggressiven Phänotyp einhergeht (Jauliac *et al.*, 2002; Mancini und Toker., 2009; Duque *et al.*, 2005; Chen und O'Connor, 2005; Robbs *et al.*, 2008; Gräf *et al.*, 2001; Buchholz *et al.*, 2006; Lagunas und Clipstone, 2009; König *et al.*, 2010a). Die Überexpression von konstitutiv aktivem NFATc1 induziert die Zelltransformation von 3T3-L1-Fibroblasten (Neal und Clipstone, 2003). Zudem sind Proliferation und substratunabhängiges Wachstum von Pankreaskarzinomzellen abhängig von Calcineurin und der darauffolgenden nukleären Translokation von NFATc1 (Buchholz *et al.*, 2006). NFAT-Proteine

induzieren nach Stimulation die Expression wichtiger Zellzyklusregulatoren wie CDK 4, CDK 6 und Cyclin D1 und unterstützen damit die Zellzyklusprogression (Neal und Clipstone, 2003; König *et al.*, 2010a). Ferner induziert die TGF- β -abhängige Induktion von NFATc1 und NFATc2 die Transkription des Proto-Onkogens c-myc – ein wichtiges Ereignis in der TGF- β -induzierten Wachstumsstimulation im Pankreaskarzinom (Singh *et al.*, 2010). Die genetische Inaktivierung von NFATc1 oder NFATc2 ist schließlich mit einer Proliferationshemmung *in vitro* und *in vivo* sowie mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Gemcitabine-vermitteltem Zelltod verbunden (König *et al.*, 2010b). NFATc2 vermittelt das Tumorwachstum jedoch nicht nur durch die Aktivierung von Zielgenen. Vielmehr konnten unsere eigenen Arbeiten eine Wachstumsinduktion von Pankreaskarzinomzellen durch NFATc2-vermittelte Repression der Transkription nachweisen. Hierbei rekrutiert NFATc2 einen Repressorkomplex, bestehend aus der Methyltransferase Suv39H1 und dem Heterochromatinprotein 1- γ (HP1- γ). Dies verstärkt die Trimethylierung der Lysine an Histon 3 und vermittelt die Expressionshemmung des Zellzyklusinhibitors p15^{Ink4b} (Dobes *et al.*, 2011, under review). NFAT-Proteine haben weiterhin anti-apoptotische Eigenschaften in verschiedenen Tumorarten (Mancini und Toker, 2009). Des Weiteren ist NFAT an der Invasion und Migration von Pankreas- und Brustkarzinomzellen beteiligt, vermutlich durch die Regulation der Schlüsselenzyme Cyclooxygenase 2 (COX2) und Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) (König *et al.*, 2010b). Schlussfolgernd liefern NFAT-Proteine über vielschichtige Mechanismen einen entscheidenden Beitrag zur Tumorentwicklung des Pankreas. Daher ist die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren von besonderem Interesse.

2 Zielsetzung der Arbeit

NFAT erfüllt offensichtlich eine entscheidende Funktion in der Progression des Pankreaskarzinoms. Einige nachgeordnete Mechanismen, die den proliferativen Phänotyp bedingen, sind dabei charakterisiert worden. Jedoch bestehen nur wenige Hinweise darauf, welche übergeordneten Signalwege, bzw. Mechanismen eine deregulierte NFAT-Expression bzw. -Aktivität im Tumor verursachen. Da NFAT vielschichte Auswirkungen auf die Tumورprogression ausübt, ist es von Interesse, die aktivierenden und hemmenden Mechanismen des NFAT-Metabolismus zur Etablierung einer tumorspezifischen Therapie eingehend zu charakterisieren. Nichtsdestoweniger ist es schwierig, Transkriptionsfaktoren direkt in ihrer Funktion zu hemmen. Daher wird eher eine spezifische Modulation von regulierenden Faktoren angestrebt. GSK-3 β ist eine multifunktionelle Kinase, die effektiv und rasch gehemmt werden kann und einen wichtigen regulatorischen Einfluss auf NFAT ausübt. Hauptaugenmerk dieser Arbeit sollte NFATc2 sein, daher wurden zur Abgrenzung gegenüber NFATc1 für die Analysen Zelllinien verwendet, welche ausschließlich hohe Mengen NFATc2, bzw. keine der Isoformen exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Reguliert GSK-3 β das Pankreastumorstadium *in vitro* und *in vivo*?
- Gibt es einen kooperativen Zusammenhang zwischen NFATc2 und GSK-3 β im Pankreaskarzinom?
- Vermittelt GSK-3 β das Tumorstadium über NFATc2 und durch welchen Mechanismus?
- Wie kann der Einsatz von GSK-3 β -Inhibitoren in der Tumorthapie des Pankreaskarzinoms derzeit bewertet werden?

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
2100 Agilent Bioanalyser	Agilent Technologies (CA, USA)
5100 Cryo 1°C Freezing Container "Mr.Frosty"	Nalgene Labware (Wiesbaden)
Autoklav	Stiefenhofer (München)
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Brutschrank WTB Binder	Heraeus Instruments (Dreieich)
DLReady™ Luminometer	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific (Dreieich)
Feinwaage Mettler PM4000	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Kühlzentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Liquid Scintillation Counter Wallace 1410	Pharmacia (Freiburg)
Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Mikrotom	Leica (Wetzlar)
Multiskan FC Microplate Photometer	Thermo Scientific (Dreieich)
NanoDrop 1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Pipetten	Discovery (Langenfeld) Gilson (Limburg)
Power300	Stratagene (Heidelberg)
FeatherVolt™ 500	Fisher Scientific (Schwerte)
Real-time PCR Maschine ABI Prism 7000	Applied Biosystems (Darmstadt)
Schüttler	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Biophotometer	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments (Dreieich)
Stickstofftank	Tec-lab (Idstein)
Thermoblock Dri-Block DB2	Techne AG (Jahnsdorf)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph Instruments (Schwabach)
Vaccum Concentrator	Bachofer (Reutlingen)

Vortexer MS1 Minishaker	IKA (Staufen)
Wasserbad	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Western Blot Kammer	Biorad (München)
Zentrifugen	
Picofuge™	Stratagene (Heidelberg)
Biofuge Pico	Heraeus Instruments (Dreieich)
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments (Dreieich)
Labofuge GL	Heraeus Instruments (Dreieich)

3.2 Materialien

Material	Firma
10 cm Petrischalen	Thermo Scientific Nunc (Langenselbold)
2 ml Cryoröhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
96-well Platten für BrdU	Perkin-Elmer (Rodgau)
Deckgläschen	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Einweg Nadeln, Spritzen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Glaswaren	Schott (Mainz)
Kultivierungsplatten (6, 12, 24, 96 Vertiefungen)	Thermo Scientific Nunc (Langenselbold)
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Parafilm	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Polypropylengefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Röntgenfilm (18 x 24 cm)	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Sterilfilter (0.2 µm/ 0.45 µm)	Schleicher & Schüll (Dassel)
Whatman Gel Blotting Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Zellkulturflasche (50, 250, 500 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturschale (60 mm, 90 mm)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)

3.3 Chemikalien

Name	Herkunft
[methyl-3H]Thymin 50 Ci/mmol 1mCi/ml	Amersham Biosciences (Freiburg)
Aceton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ampicillin	SIGMA (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
AR-A014418	Calbiochem (Darmstadt)
BioRad protein assay	BioRad (München)
Bromophenolblau	SIGMA (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Cycloheximid (CHX)	Biomol (Hamburg)
CsA	SIGMA (Deisenhofen)
4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA (Deisenhofen)
Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Amersham™ ECL (Plus) Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences (Freiburg)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Formaldehyd	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycerin (87%)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Hämalaun, sauer nach Mayer	Waldeck GmbH & Co. (Münster)

Histoprime[®] HistoGreen	Linaris GmbH (Wertheim-Bettingen)
Hepes	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ionomycin	SIGMA (Deisenhofen)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kälberserumalbumin	SIGMA (Deisenhofen)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Matrigel	BD Biosciences (Heidelberg)
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Invitrogen (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Milchpulver	SIGMA (Deisenhofen)
MG132	Calbiochem (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natronlauge	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
4% Paraformaldehyd (PFA)	USB Corporation (Cleveland, USA)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
Polyacrylamid	AppliChem (Darmstadt)
Polybrene	Millipore (Eschborn)
Ponceaurot	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Proteaseinhibitor-Tablette (complete mini)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
Protein A-Agarose	Upstate (Schwalbach)
Protein G-Agarose	Upstate (Schwalbach)
Restore[™] Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (Dreieich)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Streptavidin-Agarose-Beads	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
SYBR[®] Green	Applied Biosystems (Darmstadt)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tween[®]20	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Trichloressigsäure (TCA)	SIGMA (Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid (20%)	Merck (Darmstadt)

3.4 Standards

Name	Hersteller
Gene Ruler™ 100bp ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
PageRuler™ Prestained	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)

3.5 Kits

Name	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche Applied Science (Mannheim)
Dual Luciferase Reporter Assay Kit	Promega (Mannheim)
NucleoSpin® Plasmid	Machery-Nagel GmbH (Düren)
Omniscript® Reverse Transcriptase Kit	Qiagen (Hilden)
PCR purification kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit Qiagen (Hilden)	Qiagen (Hilden)
QIASHredder	Qiagen (Hilden)
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Heidelberg)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Vectastain®ABC Kit	Vector Laboratories (CA, USA)

3.6 Vektoren und Konstrukte

Name	Plasmid	Insert	Herkunft/Referenz
c.a. GSK-3β	pcDNA 3	HA-GSK-3β S9A	Addgene/Jim Woodgett
c.a. GSK-3β	pBabe	Myc-GSK-3β S9A	Addgene/Brendan D. Manning
cisNFAT	pLuc	Drei hintereinander geschaltete NFAT Bindungssequenzen des COX-2 Promotors	Stratagene (Heidelberg)
HA-NFATc2 pSP2	pcDNA 3.1 (+)	mNFATc2 A215G/A219G/A223E	Selbst hergestellt
HA-NFATc2 ΔSP2	pcDNA 3.1 (+)	mNFATc2 S215A/S219A/S223A	Selbst hergestellt
HA-wt-NFATc2	pcDNA3.1 (+)	wt mNFATc2	Selbst hergestellt

NFATc2 pSP2	pQCXIP	mNFATc2 A215G/A219G/A223E	Selbst hergestellt
NFATc2 ΔSP2	pQCXIP	mNFATc2 S215A/S219A/S223A	Selbst hergestellt
pD1-Luc	pLuc	Cyclin D1-Promotor	Roland Schmidt, Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 2945-9
pQCXIP att	pQCXIP	Leervektor mit integrierten att-Stellen	Dr. Thorsten Stiewe, Marburg
wt GSK-3β	pcDNA 3	HA-wt GSK-3β	Addgene/Jim Woodgett
wt NFATc2	pQCXIP	HA-NFATc2 wt	Selbst hergestellt
wt NFATc2	pENTR	HA-wt NFATc2	Addgene/Anjana Rao
wt STAT3	pRC/CMV	STAT3 wt	Addgene/Jim Darnell
STAT3 Y705F	pRC/CMV	STAT3 Y705F	Addgene/Jim Darnell

3.7 Enzyme

Enzym	Hersteller
EcoRI	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Oligo-dT-Primer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen (Karlsruhe)
SUPERaseIN™ RNase Inhibitor	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermo-Start Taq-DNA-Polymerase	ABgene (Hamburg)

3.8 Oligonukleotide

Verwendete siRNA

Name	Sequenz	Hersteller
Silencer® Negative Control siRNA	Nicht angegeben	Applied Biosystems (Darmstadt)
GSK-3α	siGENOME ON-TARGET plus SMARTpool duplex (9)-(12)	Dharmacon (Dreieich)
GSK-3β	siGENOME ON-TARGET plus SMARTpool duplex (10)-(13)	Dharmacon (Dreieich)

GSK-3α/β	Nicht angegeben	Cell (Danvers, USA)	Signaling
NFATc2	5'CCAUUAAACAGGAGCAGAATT 3'	Applied (Darmstadt)	Biosystems
STAT3	5'GCACAAUCUACGAAGAAUUCTT 3'	Applied (Darmstadt)	Biosystems

Verwendete Primer für real-time PCR

Name	Sequenz
Cyclin D1	5' TCTTATTGCGCTGCTACCGTT 3' 5' ACTGATCCTCCAATAGCAGCAAA 3'
xs-13	5' GTCGGAGGAGTCGGACGAG 3' 5' GCCTTTATTTCTTGTTTTGCAAA 3'

Oligonukleotide für DNA-Pulldown

Name	Sequenz
NFAT consensus for	5' TCTAAGGAGGAAAACTGTTTCATG 3'
NFAT consensus rev	5' CATGAAACAGTTTTTCCTCCTTAGA 3'

Primer für zielgerichtete Mutagenese

Name	Sequenz
S215A und S219A for	5' GCTCATTATGACCCCAGAACCGATCCAATAATG 3'
S215A und S219A rev	5' CATTATTGGATCGGTTCTGGGGTCATAATGAGC 3'
S223A for	5' CCGCTCCAATAATGGCACCTCGAACCAGCC 3'
S223A rev	5'GGCTGGTTCGAGGTGCCATTATTGGAGCGG 3'
A215D und A219E for	5' GCTCATTATGACCCCAGAACCGATCCAATAATG 3'
A215D und A219E rev	5' CATTATTGGATCGGTTCTGGGGTCATAATGAGC 3'
A223E for	5' CCGATCCAATAATGGAACCTCGAACCAGCC 3'
A223E rev	5'GGCTGGTTCGAGGTTCCATTATTGGATCGG 3'

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Methoden im Umgang mit DNA

3.9.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und zielgerichtete Mutagenese

Die Polymerase-Kettenreaktion bzw. PCR („*polymerase chain reaction*“) dient zur *in vitro* Amplifikation von Nukleinsäuren. Zum Austausch von drei Serine in der SP2-Region des NFATc2-Proteins durch Alanin bzw. Glutamat wurde eine PCR unter Verwendung des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 12 aufgelistet. Als Templates dienten wt NFATc2 (murin) im pcDNA3.1-Vektor bzw. bakteriellen Expressionsvektor pENTR für die Herstellung von NFATc2 Δ SP2 und letzteres für die Herstellung von NFATc2 pSP2. Folgender Ansatz und folgendes PCR-Programm wurden dabei verwendet:

PCR-Ansatz:

0,6 μ l DMSO

1,5 μ l 10 x Reaktionspuffer

0,3 μ l dNTP-Mix (20 mM Stock)

0,45 μ l Primer_{for} (10pmol Stock)

0,45 μ l Primer_{rev} (10pmol Stock)

1 μ l Template (100 ng)

0,3 μ l Turbo-*Pfu*

add 15 μ l H₂O

PCR-Programm:

Vor-Denaturierung 96°C; 30 s

Denaturierung 96°C; 30 s

Annealing 55°C; 1 min

Elongation 68°C; 10 min

} 18 Zyklen

End-Elongation 68°C; 2 min

+ 0,3 µl *DpnI*, 1h, 37°C

Die erfolgreiche Mutation wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.9.1.2 Herstellung der retroviralen Expressionsvektoren

Retrovirale Expressionsplasmide wurden unter Verwendung des Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen) hergestellt. Dabei wurden die pENTR wt NFATc2/ΔSP2/pSP2-Plasmide (im Folgenden allgemein „pENTR NFATc2“ genannt) mit dem retroviralen pQCXIP-Vektor (enthält die zur Rekombination benötigten *att*-Stellen) in folgendem Ansatz rekombiniert:

150 ng pENTR NFATc2

150 ng pQCXIP-Vektor

add 8 µl Tris-HCl/EDTA (TE)-Puffer, pH 8

+ 2 µl LR-Clonase Mix,

1h, RT

+ 1 µl Proteinase K

10 min, 37°C

2 µl des Ansatzes wurden in „MAX Efficiency® DH5α™ competent cells“ (Invitrogen) transformiert. Die erfolgreiche Rekombination wurde mittels Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.9.1.3 Restriktion von DNA

Zur Spaltung von DNA-Fragmenten wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz (50µl):

10 µg DNA (pQCXIP)

5 µl 10x Buffer EcoRI (NEB)

0,5 µl *EcoRI*

ad 50 µl H₂O

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

3.9.1.4 Transformation von *E. coli* Zellen

Verwendete Bakterienstämme

Name	Hersteller
One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen
MAX Efficiency® DH5αTM Competent Cells	Invitrogen

Zur Transformation der Plasmide wurden 5 µl PCR-Produkt, bzw. 2 µl Rekombinationsansatz mit 100 µl der entsprechenden *E. coli* Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s und eine Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium erfolgte eine Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator (100 rpm) für 60 min. 70 µl dieses Ansatzes wurde auf Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus den erhaltenen Bakterienkolonien wurden 3 ml-Übernachtskulturen mit Zugabe von Ampicillin angeimpft.

LB-Flüssigmedium:

10 g Typton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

auf 1000 ml H₂O, nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin

LB-Agarplatten:

10 g Typton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

15 g Bacto-Agar

auf 1000 ml H₂O, nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin

3.9.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus kompetenten *E. coli*-Bakterien erfolgte unter Nutzung des NucleoSpin®Plasmid Kits (Clontech) bzw. QIAGEN®Plasmid Maxi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers, ausgehend von einer 3 ml bzw. 250 ml Übernachtskultur mit Zusatz von Ampicillin.

3.9.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmungen der isolierten RNA-Proben bzw. DNA erfolgten mit dem NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Nur 1,5 µl der unverdünnten Lösung wird benötigt, um verlässliche und reproduzierbare Messwerte zu erhalten. Die Nukleinsäurekonzentration sowie –reinheit wird durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Das NanoDrop®-Spektrophotometer liefert zusätzlich die Möglichkeit einer graphischen Darstellung des Absorptionsspektrums innerhalb der Wellenlängen von 220 nm bis 350 nm. In diesem Wellenlängenbereich können die Absorptionsmessung beeinflussenden Substanzen wie Lösungsmittel- und Proteinverunreinigungen der isolierten RNA detektiert werden.

3.9.1.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 1%igen TBE-Agarosegel mit 1 µl/100 ml Ethidiumbromid bei 80-120 mV. Als Laufpuffer diente 1x TBE.

Agarosegel:

1 g Agarose

100 ml 1x TBE-Puffer

1x TBE-Puffer:

40 mM TrisBase

20 mM Borat

1 mM EDTA

3.9.2 Methoden im Umgang mit RNA

3.9.2.1 Isolierung von RNA aus Zelllinien und Geweben

Die RNA-Isolierung aus Zelllinien sowie aus Xenografttumoren erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.9.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Omniscript® Reverse Transkriptase Kit (Qiagen) nach Protokoll durchgeführt. Zur Synthese des Erststranges wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz für Reverse Transkription (1x):

2 µg RNA

0,5 µl Oligo-dT-Primer (Ambion)

ad 11 µl H₂O, Inkubation bei 70°C für 5 min

+ 2 µl dNTPs (5 mM Stock)

+ 2 µl Puffer (10x)

+ 0,5 µl SUPERaseIn™ (Ambion)

+ 1 µl Reverse Transkriptase Superscript II

ad 9 µl H₂O, mit dem 11 µl Ansatz mischen, Inkubation bei 37°C für 60 min

3.9.2.3 Quantitative real-time PCR

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe des ABI Prism 7700 Sequence Detector Systems (Applied Biosystems) und dem SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Die verwendeten Primer (s. Kapitel 3.8) wurden mit der PrimerExpress® Software ausgewählt. Als Referenzgen diente xs-13 (Z36785.1; Gress *et al.*, 1996), bzw. Cyclophilin.

Ansatz:

10 µl SYBR® Green (Applied Biosystems)

0,1 µl Primer_{for} (10 pmol Stock)

0,1 µl Primer_{rev} (10 pmol Stock)

1 µl cDNA

8,8 µl H₂O

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Applied Biosystems) ausgewertet.

3.10 Zellbiologische Methoden

3.10.1 Kultivierung der Zelllinien

Die nachstehende Tabelle fasst die in der Arbeit verwendeten Zelllinien, sowie deren Abstammung, Herkunft und Kultivierungsmedien zusammen:

Zur Abgrenzung gegenüber der NFATc1-Isoform wurden Zellen mit hoher endogener Expression von NFATc2 (PaTu8988t, IMIM-PC1), bzw. sehr geringer endogener NFATc2-Expression (Suit028, Suit007) verwendet, die kein NFATc1 exprimieren.

Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Kultivierungsmedium	Herkunft
PaTu8988t	Lebermetastase/ Pankreaskarzinom	DMEM + 10% FCS + 2,5 mg/ml Gentamycin	DSMZ, Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
PaTu8988t pQCXIP mock, wt NFATc2 bzw. ΔSP2/pSP2	PaTu8988t; stabil transfiziert mit pQCXIP mock, wt NFATc2 bzw. ΔSP2/pSP2	DMEM + 10% FCS + 1 µg/ml Puromycin	Selbst hergestellt
PaTu8988t pBabe mock, c.a. GSK-3β	PaTu8988t; stabil transfiziert mit pBabe mock, c.a. GSK-3β	DMEM + 10% FCS + 1 µg/ml Puromycin	Selbst hergestellt
IMIM-PC1	Lebermetastase/ Pankreaskarzinom	DMEM + 10% FCS + 2,5 mg/ml Gentamycin	FX Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spain (Vila <i>et al.</i> , 1995)
Suit028	Lebermetastase/ Pankreaskarzinom	DMEM + 10% FCS + 2,5 mg/ml Gentamycin	T Iwamura, Miyazaki Medical Colleges, Japan (Taniguchi <i>et al.</i> , 1992)
Suit028 pQCXIP mock, wt NFATc2 bzw. ΔSP2/pSP2	Suit028; stabil transfiziert mit pQCXIP mock, wt NFATc2 bzw. ΔSP2/pSP2	DMEM + 10% FCS + 1 µg/ml Puromycin	Selbst hergestellt

Suit007	Lebermetastase/ Pankreaskarzinom	DMEM + 10% FCS + 2,5 mg/ml Gentamycin	T Iwamura, Miyazaki Medical Colleges, Japan (Taniguchi <i>et al.</i> , 1992)
Suit007 pQCXIP mock, wt NFATc2	Suit007; stabil transfiziert mit pQCXIP mock, wt NFATc2	DMEM + 10% FCS + 2 µg/ml Puromycin	Selbst hergestellt
LinxA		DMEM + 10% FCS + 100 µg/ml Hygromycin	Open Biosystems (Huntsville, USA)

Kultivierungsmedien und Zusätze

Name	Hersteller
1x PBS	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
1x Trypsin/EDTA	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
Hygromycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Puromycin	SIGMA (Deisenhofen)

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, wobei ihr Wachstum lichtmikroskopisch kontrolliert wurde. Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vereinzelt. Etwa ein Fünftel bis ein Zehntel der Zellen wurde weiter kultiviert. Die Zellen wurden routinemäßigen Mykoplasmentests unterzogen. Weiterhin erfolgte in verschiedenen Versuchen die Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen des GSK-3β-Inhibitors AR-A014118 (Calbiochem), Ionomycin (Sigma), des Proteasominhibitors MG132 (Calbiochem) und des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (Sigma).

3.10.2 Auftauen von Zellen

Zur Rekultivierung wurden Zellen, welche in Kryogefäßen und 10% DMSO (v/v) in flüssigem Stickstoff gelagert waren, in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und in einem Kultivierungsgefäß bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Ein Mediumwechsel am nachfolgenden Tag diente zur Entfernung der DMSO-Rückstände.

3.10.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit 10% DMSO (v/v) in ein Kryogefäß gegeben. Die Kryogefäße wurden anschließend über Nacht bei -80°C in einem Kryocontainer („Mr. Frosty“; Nalgene) gelagert, um eine langsame Abkühlung von 1°C pro Minute zu gewährleisten. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.10.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Hämozytometer mit der Einteilung nach Neubauer eingesetzt. Vor der Zellzahlbestimmung erfolgte eine Vereinzelung der Zellen mit Trypsin/EDTA. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und eine Probe wurde am oberen Rand des Deckglases, welches vorher auf der Zählkammer positioniert wurde, aufgetragen. Zur Ermittlung der Zellzahl in einem ml wurden die Zellen in vier Eckquadranten gezählt und der Mittelwert wurde mit dem Faktor 10^4 multipliziert.

3.10.5 Transfektion der Zelllinien

Zur Transfektion von DNA-Konstrukten (Kap. 3.6) wurden alle verwendeten Zelllinien mit Transfast™ Reagenz (Promega) oder Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) nach den jeweiligen Herstellerprotokollen behandelt. „*Small-interfering RNA*“ (siRNA) wurde mittels siLentFect™ Lipid Reagent (Biorad) gemäß Angaben des Herstellers transfiziert.

3.10.6 Herstellung und Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden die zuvor klonierten Konstrukte pQCXIP wt NFATc2, bzw. NFATc2 Δ SP2/pSP2 und pBabe c.a. GSK-3 β mittels Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) in LinxA-Zellen (Open Biosystems) transfiziert. 48 h und 72 h danach erfolgte die „*spin infection*“ der Zielzellen PaTu8988t, Suit007 und Suit028. Hierbei wurde das Retrovirus-enhaltende Medium durch ein 0,45 μ M Filter gedrückt, mit 2 μ g/ml Polybrene versetzt und auf die Zielzellen gegeben. Daraufhin wurde 1 h bei 1500 rpm und 37°C zentrifugiert. 4 h nach der Transduktion wurde das Medium gewechselt. Zur Selektion erfolgreich transduzierter Zellen wurden diese 48 h nach der letzten „*spin infection*“ in Selektionsmedium (DMEM + 10% FCS + 1 bzw. 2

mg/ml Puromycin) kultiviert. Die positiven Mischklone wurden schließlich mittels Western-Blot-Analyse auf Expression der NFATc2- bzw. GSK-3 β -Konstrukte getestet.

3.10.7 Luciferase-Reportergenassay

Für den Luciferase-Reportergenassay wurden $4,5 \times 10^4$ Zellen in 24-well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden 200 ng der angegebenen Konstrukte in einem Dreifachansatz in die Zellen transfiziert. Die Luciferase aus *Photinus pyralis* („Firefly“) diente hierbei als Reportergen. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden jeweils 15 ng eines Renilla-Reporterkonstruktes, welches die Luciferase der *Renilla reformis* exprimiert, ko-transfiziert. 24 h später erfolgte die Zellernte, wobei die Zellen 1x mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 100 μ l des 1x passiven Lysepuffers (Promega) unter 15 minütigem Schütteln bei RT lysiert wurden. Zur Ermittlung der Luciferaseaktivität wurden die Substrate für beide Luciferaseenzyme aus dem „Dual-Luciferase®-Reporter Assay System“ (Promega) nacheinander zugegeben und die Werte mittels eines DLReady™ Luminometers (Berthold Technologies) gemessen. Der Quotient Fireflywert/Renillawert ergab schließlich die relative Luciferaseaktivität. Dargestellt wurden Mittelwerte der Dreifachbestimmung mit zugehöriger Standardabweichung.

Bei der Durchführung eines Reportergenassays im Rahmen einer siRNA Transfektion wurden zunächst 2×10^5 Zellen in 6-well-Platten ausgesät. Daraufhin wurden die angegebenen siRNA-Oligonukleotide transfiziert. 24 h später wurden die Transfektanten in 24 wells umgesetzt und wie oben beschrieben mit den entsprechenden Reportergenplasmiden transfiziert und dem Assay unterzogen.

3.10.8 Wachstumssays

3.10.8.1 Thymidin-Proliferations-Assay

Dieser Assay quantifiziert den Einbau von ^3H -radioaktiv markiertem Thymidin in die sich replizierende DNA während der Zellteilung. Hierzu wurden 7×10^4 Zellen in 12-well-Platten ausgesät und wie angegeben behandelt oder transfiziert. Im Rahmen einer siRNA Transfektion wurden 2×10^5 Zellen in 6-well-Platten ausgesät und entsprechend mit siRNA Oligonukleotiden transfiziert. 24 h

danach wurden die Zellen in 12-well-Platten umgesetzt. 5 h vor Ende der Inkubationszeit wurden 5 μCi ^3H -Thymidin pro well hinzugegeben und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit 5% Trichloressigsäure (TCA) und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach der 30 minütigen Lyse mit 1M NaOH erfolgte die Quantifizierung der Radioaktivität in einem Scintillation Counter (Pharmacia).

3.10.8.2 BrdU-Proliferationsassay

1×10^4 Zellen wurden in 96-well-Platten ausgesät und mit siRNA transfiziert, bzw. wie angegeben behandelt. Der Einbau von BrdU wurde mit dem Cell Detection ELISA, BrdU-Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die Messung der Werte erfolgte mittels eines DLReadyTM Luminometers (Berthold Technologies).

3.10.8.3 Softagar-Assay

Zur Analyse von substratunabhängigem Wachstum wurden Softagar-Wachstumsassays in 6-well-Platten durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein Bodenagar, bestehend aus 0,5% Bacto-Agar/DMEM, gegossen. Dabei wurde 5% Bacto-Agar in der Mikrowelle verflüssigt, auf ca. 55°C abgekühlt und 1:10 mit 42°C warmem DMEM verdünnt. Pro well wurden 2 ml Medium-Agar-Mix verwendet. Nach Verfestigung des Agars wurden 10^4 Zellen mit 0,33% Bacto-Agar/DMEM vermischt und in Triplikaten ausgesät. Die Anzahl der Kolonien wurde zehn Tage nach Aussaat in vier unterschiedlichen Bereichen des wells ausgezählt.

3.11 Proteinbiochemische Methoden

3.11.1 Isolierung von Proteinen aus Zelllinien

3.11.1.1 Gesamtproteine

Zur Isolierung von Gesamtzelllysat wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 50 μl /200 μl Lysepuffer pro 6-well/10 cm-Schale wurden die Zellen abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Hierauf folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis und im Anschluss ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000 rpm für 10 min. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Lysepuffer:

50 mM HEPES pH7.5

150 mM NaCl

1 mM EGTA

10 % Glycerol

1 % TritonX-100

100 mM NaF

10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

40 μl 25x Complete Proteaseinhibitor (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim) und 10 μl PMSF (100 mM) pro 1 ml Lösung: frisch zugeben

3.11.1.2 Cytoplasmatische und nukleäre Proteine

Zur Isolierung von cytoplasmatischen und nukleären Proteinen wurden die Zellen mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1500 rpm für 3 min wurde das Pellet zunächst in 100-200 μl Puffer A aufgelöst und 15 min auf Eis inkubiert. Mittels einer Kanüle (0,45 mm Durchmesser) wurden die Zellen aufgeschlossen. Die anschließende Zentrifugation bei 3600 rpm und 4°C für 20 min trennte Zellkern sowie -trümmer vom Cytoplasmaproteinen. Letztere, im Überstand enthalten, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und einer erneuten Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 14000 rpm unterzogen. Um nukleäre Proteine zu isolieren, wurde das Zellpellet in 100-200 μl Puffer C aufgenommen, für 30-60 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (= Kernproteine) wurde in neuen Gefäßen bei -20°C gelagert.

Puffer A:

10 mM HEPES pH 7,9

10 mM KCl

0,1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

1 mM DTT und 40 μl 25x Complete Proteaseinhibitor (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim) pro 1 ml Lösung: frisch zugeben

Puffer C:

20 mM HEPES pH 7,9

0,4 M NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1 mM DTT und 40 µl 25x Complete Proteaseinhibitor (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim) pro 1 ml Lösung: frisch zugeben

3.11.1.3 Isolierung von Protein aus Geweben

Zur Isolierung von Proteinen aus Tumorgewebe wurde zunächst ein Teil Gewebe mit einem sterilen Skalpell entnommen. Dieses wurde durch Mörsern in Lysepuffer homogenisiert, und schließlich wurden die Proteine durch Ultraschall aufgeschlossen und bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt für Western-Blot-Analysen verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.11.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Hierzu wurde das Bradford Reagenz 1:5 verdünnt und je 200 µl wurden mit 1-2 µl der zu messenden Proben, bzw. mit 1-8 µl eines BSA-Proteinstandards vermischt. Die Absorptionszunahme wurde bei 595 nm im Photometer gemessen und die Proteinkonzentration wurde aufgrund der Eichgeraden des BSA-Standards errechnet.

3.11.3 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurden zunächst 500 µg Gesamtzelllysate, bzw. 100-150 µg nukleäre Proteine in einem sog. „*preclean*“ Schritt für 30 min mit 20 µl Protein G- bzw. A-Beads sowie 1 µl Maus- bzw. Kaninchen-IgG bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß übertragen. Dieser wurde mit den angegebenen Antikörpern versetzt und über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden nochmal 50 µl Beads zu den Proben gegeben und für eine weitere Stunde im Überkopfschüttler inkubiert. Der Ansatz wurde danach dreimal mit IP-Waschpuffer gewaschen, mit jeweils 40 µl 1x Lämmli versetzt und bei 95°C 10

min aufgekocht. Die Proben wurden entweder einer Western-Blot-Analyse unterzogen oder bei -20°C gelagert.

IP-Waschpuffer:

10 mM Tris (pH 7,5)

150 mM NaCl

0,5 % TritonX-100

0,25% NP40

5x Lämmli:

225 mM Tris/HCl pH6,8

50% Glycerin

5% SDS

100 mM DTT

0,02% Bromphenolblau

50 µl 2-Mercaptoethanol zu 950 µl 5x Lämmli frisch zugeben

3.11.4 DNA-Pulldown

Zur Analyse von Protein-DNA Interaktionen wurden 100-150 µg nukleäre Proteine mit 20 µl der angegebenen biotinylierten Oligonukleotide versetzt und für 3 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60 µl Streptavidin-gekoppelten Agarose-*Beads* (Sigma-Aldrich) und eine weitere Stunde Inkubation. Daraufhin wurden die Ansätze zweimal mit 1x PBS gewaschen, mit 40 µl 2x Lämmli versetzt und 10 min aufgekocht. Die Proben wurden entweder für Western-Blot-Analysen verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.11.5 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 10- bzw. 15%ige Polyacrylamidgele im 8 cm x 10 cm x 1,5 mm Format gegossen. Hierbei wurden Trenn- und Sammelgel nach unten angegebenem Rezept vorbereitet und etwa 1 h bei RT polymerisiert. 15-20 µg der

Proteinproben wurden mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Taschen der Polyacrylamidgele mit den Proben beladen, welche schließlich bei konstanter Spannung von 120 V bzw. 160 V in 1x SDS-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Ansatz für 2 Trenngele (Volumina für 10% bzw. 15%):

3,7 bzw. 2 ml H₂O

2,5 ml Trenngelpuffer

3,3 bzw. 5 ml 30% Acrylamid

0,5 ml Glycerol

20 µl 10% APS

20 µl TEMED

Ansatz für 2 Sammelgele:

4 ml fertiger Sammelgelpuffer

10 µl 10% APS

10 µl TEMED

Fertiger Sammelgelpuffer:

59 ml H₂O

25 ml Trenngelpuffer

15 ml 30% Acrylamid

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

0,4% SDS

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

0,4% SDS

10 x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris-Base

1,92 M Glycin

1% SDS

3.11.6 Western-Blot-Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel erfolgte der Transfer derselben auf eine immobilisierte Nitrocellulose (NC)-Membran. Die Übertragung wurde mittels des sogenannten Tank-Blot Verfahrens bei 300-400 mA für 60 bis 90 min bei 4°C erreicht. Im Anschluss wurde die Membran 1 h mit Blockpuffer und danach über Nacht bei 4°C mit den angegebenen Primärantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x 10 min mit TBST gewaschen und einer einstündigen Inkubation mit einem speziesspezifischen, sekundären Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper unterzogen. Nach 3 x 10 minütigem Waschen wurden die Proteine schließlich mittels Enhanced Chemiluminescence Reagenz (ECL)-Entwicklerlösung und Filmen (Amersham) detektiert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Software ImageQuant 5.1.

Verwendete Primärantikörper für Western-Blot-Analysen

Name	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
NFATc2	Maus	Santa Cruz	1:500
p-NFATc2 (Ser 213,217,221)	Kaninchen	Santa Cruz	1:500
GSK-3β	Kaninchen	Cell Signalling	1:1000
p-Glykogensynthase (Ser641, 645)	Kaninchen	Invitrogen	1:1000
Cyclin D1	Maus	Cell Signalling	1:1000
Cyclin D3	Maus	Cell Signalling	1:1000
CDK 4	Maus	Cell Signalling	1:1000

CDK 6	Maus	Cell Signalling	1:1000
STAT3	Kaninchen	Cell Signalling	1:1000
p-STAT3 (Y705)	Kaninchen	Cell Signalling	1:1000
Flag-HRP	Maus	Sigma	1:1000
Flag	Maus	Sigma	1:1000
HA	Maus	Cell Signalling	1:1000
HA	Kaninchen	Cell Signalling	1:1000
Kaninchen-/Maus-IgG	Kaninchen/Maus	Upstate	1,5 µg

Verwendete Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen

Name	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus	Pferd	Cell Signalling	1:5000-1:10000
Anti-Kaninchen	Ziege	Cell Signalling	1:5000-1:10000

Transblotpuffer (1000ml):

14,4 g Glycin

3 g Tris

100 ml Methanol

Blockpuffer:

5% Milchpulver (w/v) in 1 x TBST

1 x TBST:

1 x TBS-Puffer

0,1% Tween®20 (v/v)

10 x TBS:

1,37 M NaCl

0,2 M Tris

pH 7,6

3.12 Tierversuche

Die Tiere wurden nach den Richtlinien und Protokollen der Ethikkommission der Universität Marburg gehalten. $1-1,5 \times 10^6$ Suit028, bzw. IMIM-PC1-Zellen wurden 1:1 mit Matrigel (BD Biosciences) vermengt (nur IMIM-PC1-Zellen) und subkutan in athymische Nude-Foxn1^{nu} Nacktmäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln) injiziert. Nach der Etablierung von messbaren Tumoren wurden die Mäuse (nach Injektion der IMIM-PC1-Zellen) dreimal wöchentlich intraperitoneal mit 10 mg/kg KG AR-A014118 (in 10% DMSO) behandelt. Zustand, Gewicht und Tumorgroße wurden einmal wöchentlich erhoben. Nach vier Wochen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation geopfert. Die Tumoren wurden isoliert, dabei wurde eine Hälfte in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für RNA- und Proteinanalysen bei -80°C gelagert. Die andere Hälfte wurde für immunhistochemische Analysen über Nacht in Formaldehyd (Roth) bei 4°C fixiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Tumoren durch Inkubation in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen (70%-100%) entwässert, in Methylbenzoat und Xylol inkubiert und schließlich in Paraffin eingebettet.

3.13 Immunhistochemie

Zur Färbung von Proteinen auf Gewebeschnitten wurden aus den in Paraffin eingebetteten Geweben zunächst mit dem Mikrotom (Leica) 4 µm dünne Schnitte hergestellt. Die Immunfärbung wurde mit dem Vectastain®ABC Kit (Vector Laboratories) durchgeführt. Die Gewebe wurden hierzu 2 x 15 min in Xylol eingelegt und in absteigenden Alkoholkonzentrationen (99%-50%) für jeweils 3 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten ein Kochschritt in Citrat, bzw. Tris/EDTA (TE)-Puffer in der Mikrowelle für 20 min und anschließendes 20 minütiges Abkühlen. Die Schnitte wurden 20 min bei RT mit Blockpuffer geblockt und schließlich über Nacht mit den angegebenen Primärantikörpern inkubiert. Die Schnitte wurden am darauffolgenden Tag 30 min bei RT mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und danach für 30 min mit einem Streptavidin-enthaltenden ABC-Komplex inkubiert. Die Visualisierung erfolgte schließlich mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB), welches eine Braunfärbung in positiven Arealen verursacht. Für eine Doppelfärbung wurde

nach der DAB-Färbung nochmal in entsprechendem Puffer gekocht und mit dem angegebenen Antikörper über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach Inkubation mit Zweitantikörper und ABC-Komplex eine Grünfärbung mit HistoGreen® (Linaris GmbH) durchgeführt. Zur Gegenfärbung der negativen Bereiche wurde Hämalun (Waldeck) verwendet.

Citratpuffer:

2,1 g Citronensäure-Monohydrat

ad 1 l H₂O, pH 6

TE-Puffer (10x):

100 mM Tris-Base

10 mM EDTA

0,05% Tween®20 pro ml: frisch zugeben

Blockpuffer:

2% (w/v) Milchpulver in PBS bzw. 2% BSA in PBS

PBS (pH 7,4):

214 ml K₂HPO₄

536 ml Na₂HPO₄

45 g NaCl

4,25 l H₂O

TBS (pH 7,4):

18,17 g Tris

26,2 g NaCl

112,5 ml HCl

2,9 l H₂O

Verwendete Antikörper für Immunhistochemie

Name	Verdünnung	Hersteller
GSK-3 β	1:200	Epitomics
NFATc2	1:100	Abcam
p-NFATc2 ^{SP2}	1:50	Santa Cruz
STAT3	1:100 – 1:200	Cell Signalling
β -catenin	1:100	Cell Signalling

3.14 Immunfluoreszenz

7×10^4 Zellen wurden in 12-well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und nach Protokoll transfiziert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd 15 min bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI)-Färbung unter einer 15 minütigen Inkubation mit 0,1 μ g/ml DAPI. Daraufhin wurde 10 min mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion der spezifischen primären Antikörper erfolgte mit sekundären, Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern. Zur Auswertung diente ein Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz

Name	Verdünnung	Hersteller
HA _{mouse}	1:200	Cell Signalling
Cy3 _{mouse}	1:500	Abnova

3.15 Statistische Auswertung

Mittelwerte und Standardabweichung (SD), bzw. Standardfehler (SE) wurden für alle numerischen Ergebnisse berechnet. Die statistische Auswertung der *in vivo* Versuche erfolgte unter Verwendung des ungepaarten, einseitigen t-Tests und $p < 0,05$ wurde als signifikant (*) und $p < 0,01$ als hoch signifikant (**) betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Die pharmakologische GSK-3-Hemmung geht mit einem verminderten Wachstum von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* einher

Die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) wurde ursprünglich wegen ihrer tumorhemmenden Rolle beschrieben. Hauptsächlich übt sie diese Funktion durch Phosphorylierung onkogener Proteine wie Cyclin D1, c-myc oder c-jun und damit verbundener Markierung dieser für den proteosomalen Abbau aus (Doble und Woodgett, 2003). Andererseits bestehen vermehrte Hinweise auf onkogene Funktionen von GSK-3 β in verschiedenen Karzinomzelllinien. So konnte im Pankreaskarzinom gezeigt werden, dass eine Hemmung der GSK-3 β Aktivität in einem verminderten Tumorzellwachstum resultiert (Ougokov *et al.*, 2005; 2006).

Zur Ermittlung der Bedeutung von GSK-3 β für die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien PaTu8988t und IMIM-PC1 wurden diese mit steigenden Konzentrationen eines pharmakologischen GSK-3 β -Inhibitors AR-A014418 (AR-A; Calbiochem) behandelt. Dieser ist als spezifischer GSK-3 β -Inhibitor beschrieben, welcher die Kinaseaktivität von 26 getesteten Kinasen nicht beeinflusst (Bhat *et al.*, 2003). Der Einbau von BrdU wurde nach 24 und 48 h gemessen. Abb. 7 zeigt eine zeit- sowie konzentrationsabhängige Abnahme der Zellproliferation von PaTu8988t- (A) und IMIM-PC1-Zellen (B) nach pharmakologischer GSK-3 β -Hemmung.

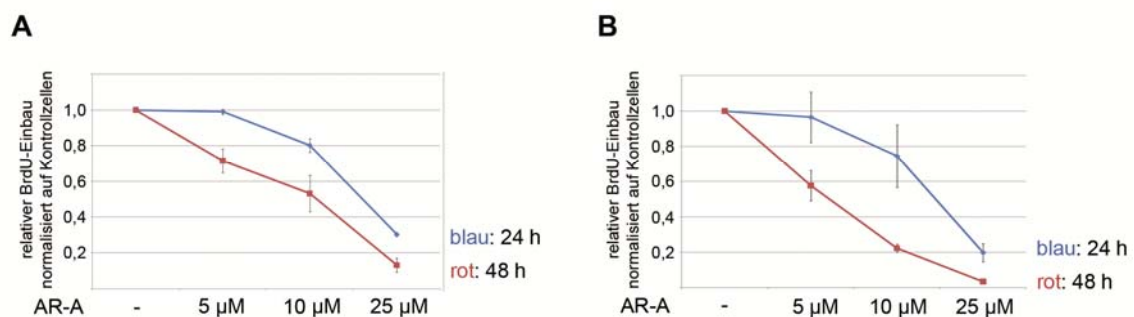


Abbildung 7: Auswirkungen einer pharmakologischen GSK-3 β -Hemmung auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien PaTu8988t und IMIM-PC1. A. PaTu8988t- und B. IMIM-PC1-Zellen wurden mit 5, 10 und 25 µM AR-A bzw. mit DMSO behandelt, nach 24 und 48 h wurde der BrdU-Einbau gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Weiterhin wurde siRNA gegen GSK-3 α , GSK-3 β , GSK-3 α/β sowie Kontroll-siRNA in PaTu8988t-Zellen transfiziert und der ^3H -Thymidineinbau sowie der BrdU-Einbau nach 48 h gemessen (Abb. 8A). Der *knockdown* von GSK-3 α bewirkte eine Proliferationshemmung von ungefähr 25%, während der GSK-3 β *knockdown* die Proliferation nicht beeinflusste. Demgegenüber konnte die Depletion beider Isoformen eine Hemmung um etwa 50% erzielen. Die Messung des BrdU-Einbaus lieferte unter gleichen Bedingungen ähnliche Ergebnisse (Abb. 8B).

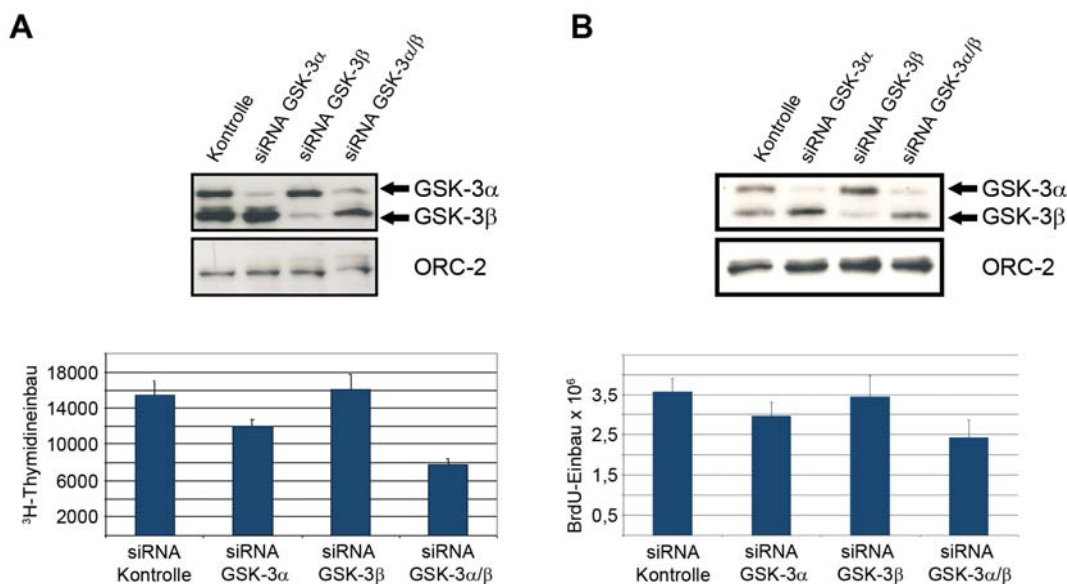


Abbildung 8: Auswirkungen einer genetischen GSK-3 β -Depletion auf die Zellproliferation. PaTu8988t-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. mit siRNA gegen GSK-3 α , β und α/β transfiziert und nach 48 h wurde der ^3H -Thymidineinbau (**A**) bzw. BrdU-Einbau (**B**) ermittelt. Der erfolgreiche *knockdown* ist jeweils im Western Blot oben dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die tumorhemmende Funktion von GSK-3 β wird teilweise dadurch vermittelt, dass Substrate phosphoryliert (z.B. β -Catenin und Cyclin D1) und damit für den Abbau im 26s-Proteasom markiert werden (Polakis, 2007). Cyclin D1 reguliert den Zellzyklus auf Ebene der G1-Phase (Sherr, 1993; Gladden und Diehl, 2005). In Western Blot-Analysen wurde daher der Einfluss einer GSK-3 β -Hemmung auf die Expression des Zellzyklusregulators Cyclin D1 untersucht. Dazu wurden IMIM-PC1-Zellen mit steigenden AR-A-Konzentrationen behandelt und nach 24 h und 48 h wurden Zelllysate hergestellt. Abbildung 9A

zeigt, dass die pharmakologische GSK-3 β -Inhibition entgegen der Erwartungen konzentrations- und zeitabhängig mit einer verringerten Expression von Cyclin D1 einhergeht. Des Weiteren war die genetische Depletion von GSK-3 β in PaTu8988t-Zellen ausreichend, um eine deutliche Expressionsreduktion von Cyclin D1 herbeizuführen (Abb. 9B). Abb. 9C zeigt außerdem mRNA-Expressionsanalysen von Cyclin D1 nach pharmakologischer GSK-3 β -Hemmung sowie nach transients Überexpression eines konstitutiv-aktiven GSK-3 β -Konstruktes (c.a. GSK-3 β), welches eine S9A-Mutation enthält und damit vor phosphorylierungsabhängiger Inaktivierung geschützt ist (s. 1.2.2). Die Cyclin D1-mRNA-Expression korrelierte dabei positiv mit der GSK-3 β -Aktivität. Darüber hinaus konnte in Luciferase-Reporterassays eine positive Korrelation der Cyclin D1-Promotoraktivierung mit der GSK-3 β -Aktivität bestätigt werden (Abb. 9D).

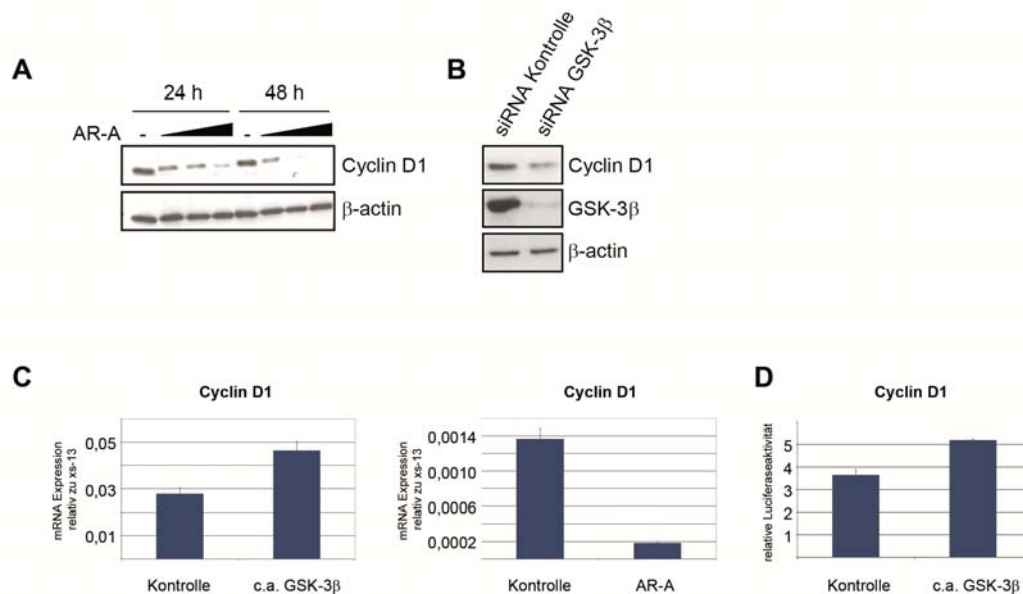


Abbildung 9: GSK-3 β -abhängige Expression des G1-Zellzyklusregulators Cyclin D1. **A.** IMIM-PC1-Zellen wurden mit 5, 15 und 25 μ M AR-A behandelt. Nach 24 h, bzw. 48 h Stunden wurden Gesamtzelllysate hergestellt und auf die Expression von Cyclin D1 analysiert. β -actin diente als Ladekontrolle. **B.** PaTu8988t-Zellen wurden mit siRNA gegen GSK-3 β transfiziert. 48 h danach wurden die Zellen lysiert und im Western Blot mit Cyclin D1- und β -actin-Antikörpern inkubiert. **C.** Links: PaTu8988t-Zellen wurden mit einem konstitutiv-aktiven GSK-3 β -Konstrukt (c.a. GSK-3 β), welches durch eine Punktmutation (S9A) gegen eine Inaktivierung geschützt ist, transfiziert. Rechts: PaTu8988t-Zellen wurden 24 h mit AR-A behandelt. Nach der Transfektion/Behandlung wurde RNA isoliert und mittels real-time PCR auf die Cyclin D1-Expression untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD relativ zur Expression des Haushaltsgenes xs-13. **D.** PaTu8988t-Zellen wurden mit dem Effektorplasmid c.a. GSK-3 β sowie mit den Reporterplasmiden Cyclin D1-Promoter und Renilla-Luciferase transfiziert und einem Luciferaseassay unterzogen. Angegeben sind die Mittelwerte aus den Quotienten der

Cyclin D1-Luciferaseaktivität und Renilla-Luciferaseaktivität \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zur Bestätigung der *in vitro* Beobachtungen wurden 1×10^6 IMIM-PC1-Zellen mit Matrigel (BD Biosciences) vermengt und subkutan in die Schultern von 12 athymischen nu/nu Nacktmäusen (Harlan-Winkelmann) injiziert. Nach Etablierung von messbaren Tumoren (ca. 2 Wochen) wurden die Tiere zufällig in zwei Gruppen eingeteilt. Die Mäuse wurden 3x wöchentlich intraperitoneal mit 10 mg/kg KG AR-A, bzw. mit der Trägersubstanz (10% DMSO) behandelt. Der Zustand der Tiere sowie die Tumorumfänge wurden einmal wöchentlich erhoben. Nach vier Wochen wurden die Tiere geopfert und die Tumoren isoliert. Abbildung 10 zeigt eine repräsentative Darstellung von jeweils einer Maus (DMSO/AR-A), bzw. der Tumoren nach der Opferung. Weiterhin sind die Wachstumskurven der Kontroll- und AR-A-Gruppen dargestellt. Die AR-A-Behandlung ging schon nach zwei Wochen mit einem signifikant verzögerten Tumorwachstum einher. Die Tumoren der Kontrollgruppen wiesen schließlich nach 4 Wochen ein 3,6-faches Wachstum auf, während das Wachstum der AR-A-behandelten Tumoren signifikant auf 2,1-fach verzögert war.

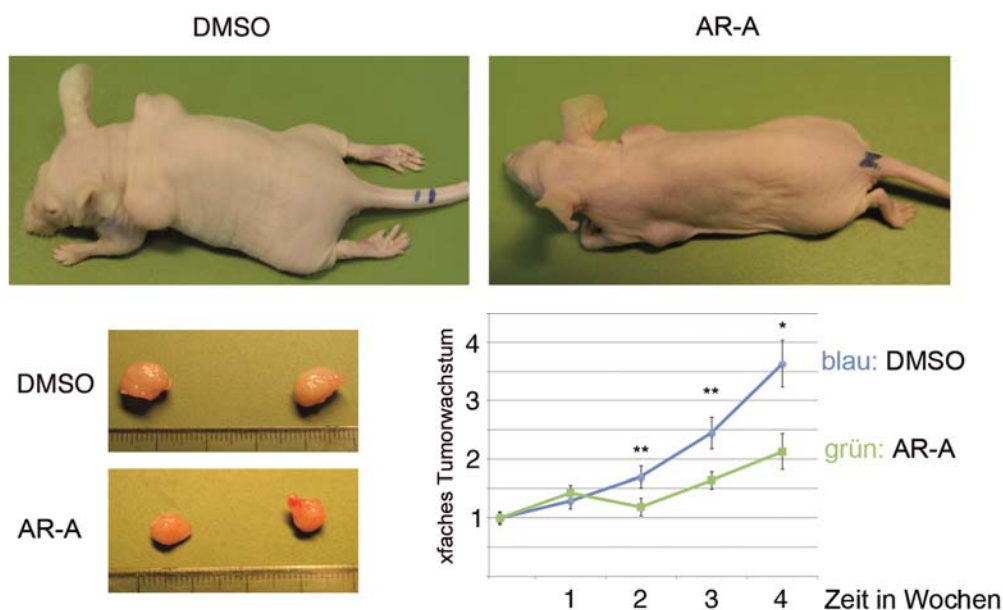


Abbildung 10: Tumorzellwachstum im Xenograftmodell nach pharmakologischer GSK-3 β -Inhibition. 1×10^6 IMIM-PC1-Zellen wurden 1:1 mit Matrigel gemischt und subkutan in 12 immundefiziente nu/nu Nacktmäuse injiziert. Nach zwei Wochen waren messbare Tumoren

etabliert und die Mäuse wurden zufällig in zwei Gruppen eingeteilt. Anschließend erfolgte die Behandlung mit AR-A (10 mg/kg KG) bzw. mit der Trägersubstanz 10% DMSO. Der Zustand der Tiere wurde einmal wöchentlich überprüft, die Tumervolumina wurden zweimal wöchentlich ermittelt. Nach vier Wochen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation geopfert und die Tumoren isoliert. Die Darstellung der Mäuse und Tumoren ist repräsentativ für die jeweiligen Gruppen. Jeweils eine Maus pro Gruppe verstarb vor Behandlungsende. Die Berechnung der Volumina erfolgte nach der Formel ($\pi \times 4/3 \times \text{Länge}/2 \times \text{Breite}/2 \times \text{Höhe}/2$). $n=5$; die Kurven stellen die Mittelwerte \pm SE der jeweiligen Messzeitpunkte normalisiert auf die Startvolumina dar. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem ungepaarten, einseitigen t-Test. $p = 0,008$; $p = 0,009$; $p = 0,02$

Da GSK-3 β maßgeblich in den Wnt/ β -Catenin-Signalweg eingebunden ist, indem sie die Proteolyse des Proto-Onkogens β -Catenin im Cytoplasma aufrechterhält und damit eine nukleäre Translokation verhindert, wurden die Konsequenzen einer AR-A-Behandlung für die β -Catenin-Lokalisation *in vivo* ermittelt. Dazu wurden die IMIM-PC1-Tumorgewebe mittels Immunhistochemie auf β -Catenin und p-Glykogensynthase gefärbt (Abb. 11). Nach AR-A-Behandlung fand zwar eine cytoplasmatische Akkumulation von β -Catenin statt, dennoch konnte keine nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der Glykogensynthase wird von GSK-3 β vermittelt, wobei die stark positive Färbung auf eine hohe GSK-3 β -Aktivität im Tumor hindeutet. Die Abnahme der Phosphorylierung hingegen spiegelt eine erfolgreiche Hemmung der GSK-3 β -Kinaseaktivität nach AR-A-Gabe wider. Daraus kann gefolgert werden, dass die pharmakologische Hemmung der GSK-3-Kinaseaktivität sowie der GSK-3 *knockdown* mit einem reduzierten Pankreaskarzinomzellwachstum einhergeht, welches unter anderem mit einer verminderten Expression von Cyclin D1 vergesellschaftet ist.

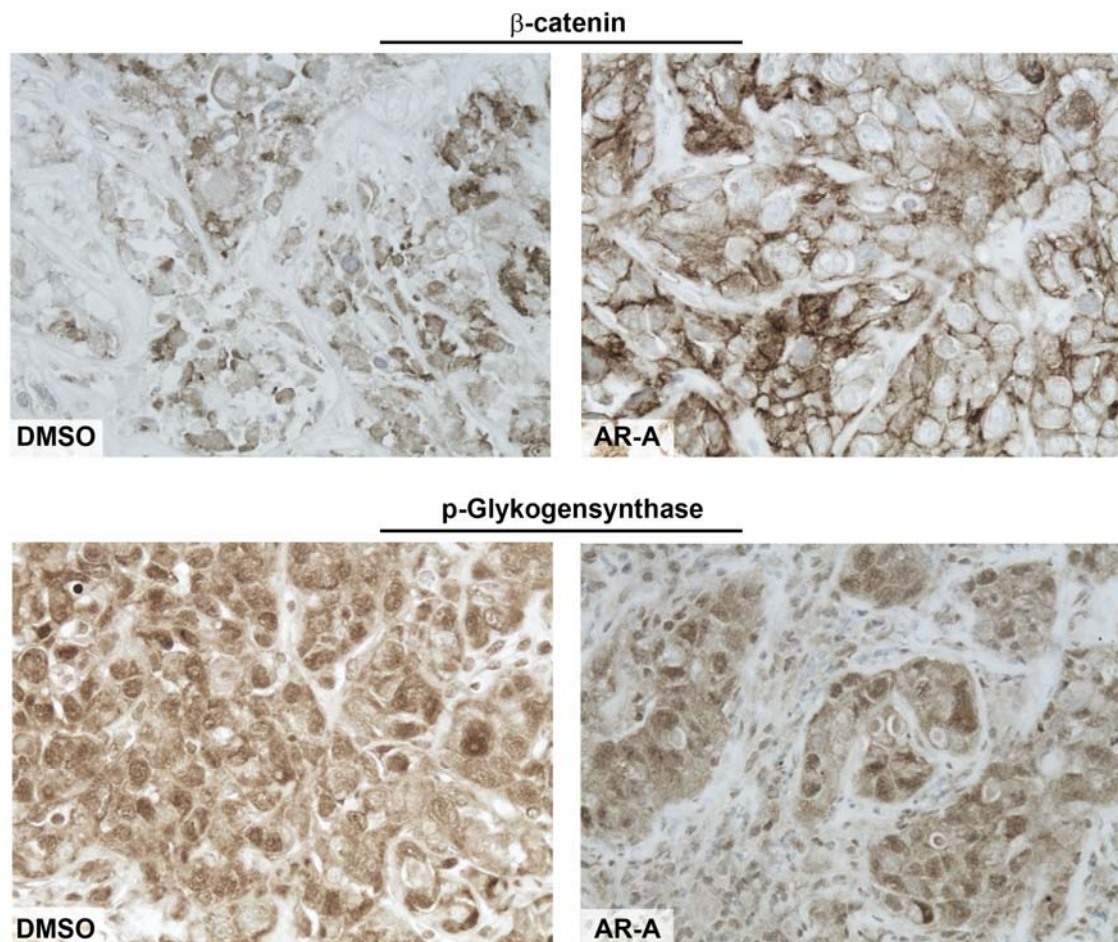


Abbildung 11: Immunhistologische Färbung der IMIM-PC1-Tumorgewebe. IMIM-PC1-Tumorgewebe wurden mit β -Catenin- und p-Glykogensynthase-Antikörpern inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit DAB, im Anschluss wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Die Abbildungen stellen 40-fache Vergrößerungen dar.

4.2 GSK-3 β beeinflusst Aktivität und Expression des onkogenen Transkriptionsfaktors NFATc2 im Zellkern

Vorarbeiten enthüllten eine entscheidende wachstumsfördernde Funktion des Transkriptionsfaktors NFATc2 im Pankreaskarzinom. Dieser übt vielschichtige regulatorische Einflüsse auf den Zellzyklus aus, unter anderem über die Induktion von G1-Cyclinen sowie über Repression des Zellzyklusinhibitors p15 (Singh *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011, in revision; Dobes *et al.*, 2011, under review). GSK-3 β ist ein Hauptmodulator der NFATc2-Signalkaskade. Ursprünglich wurde sie als NFAT-Exportkinase identifiziert, welche durch Phosphorylierung einen „Re-shuttle“ ins Cytoplasma einleitet und damit DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität terminiert (Beals *et al.*, 1997; Neal und Clipstone, 2001). Zur Abgrenzung gegenüber den Effekten durch

NFATc1 wurden für die Analysen in dieser Arbeit Zelllinien verwendet, welche entweder ausschließlich hohe Mengen an NFATc2 exprimieren (PaTu8988t, IMIM-PC1), oder sehr geringe Expressionslevel beider Isoformen aufweisen (Suit028 und Suit007; Buchholz *et al.*, 2006; s. Abb. 12).

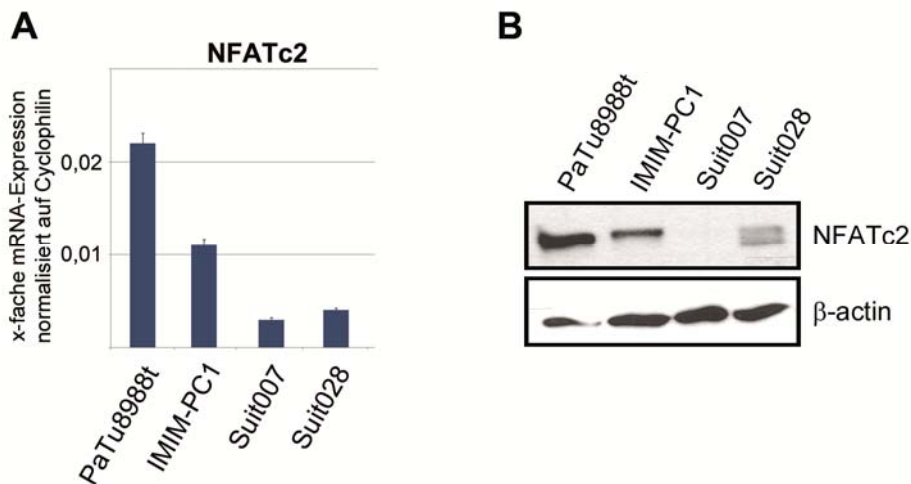


Abbildung 12: Endogene Expression von NFATc2 in verschiedenen Pankreaskarzinomzellen. mRNA (A) und Proteinlysate (B) von PaTu8988t-, IMIM-PC1-, Suit007- und Suit028-Zellen wurden auf NFATc2-Expression geprüft.

Im Nachfolgenden wurden verschiedene humane Pankreasgewebeschnitte mit einem NFATc2-Antikörper gefärbt. Die immunhistologische Analyse enthüllte - passend zu den Daten von Holzmann *et al.* (2004) - dass NFATc2 weder in azinären noch in duktalem Zellen von normalem Gewebe, noch in den frühen nicht-neoplastischen Vorstufen (PanIN-1) des Pankreaskarzinoms nachzuweisen ist. Allerdings konnte ein positives Signal in den fortgeschrittenen PanIN-2/3-Läsionen sowie in der Mehrheit der invasiven wachsenden Tumoren (25 von 36) beobachtet werden (Abb. 13). Die nukleäre Färbung deutet darauf hin, dass NFATc2 in einem aktiven Status im Pankreaskarzinom vorliegt.

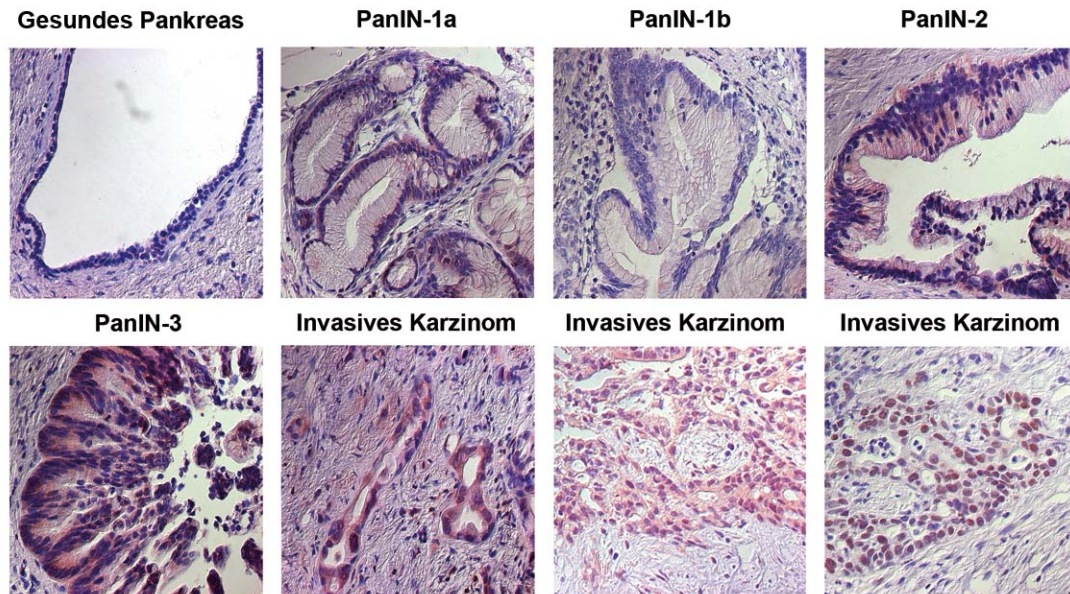


Abbildung 13: Immunhistologischer Nachweis von NFATc2 in humanen Pankreasgeweben. Gewebeschnitte von humanen Pankreata wurden mit NFATc2-Antikörpern inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit DAB, im Anschluss wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Die Abschnitte stellen 40-fache Vergrößerungen dar.

Die Aktivierung des Calcineurin/NFATc2-Signalweges durch Ionomycin führt zu einer verstärkten Zellproliferation von Zellen mit hoher endogener NFATc2-Expression. Dies erfolgt NFATc2-abhängig, da ein *knockdown* des Transkriptionsfaktors die erhöhte Proliferation antagonisieren kann (Abb. 14).

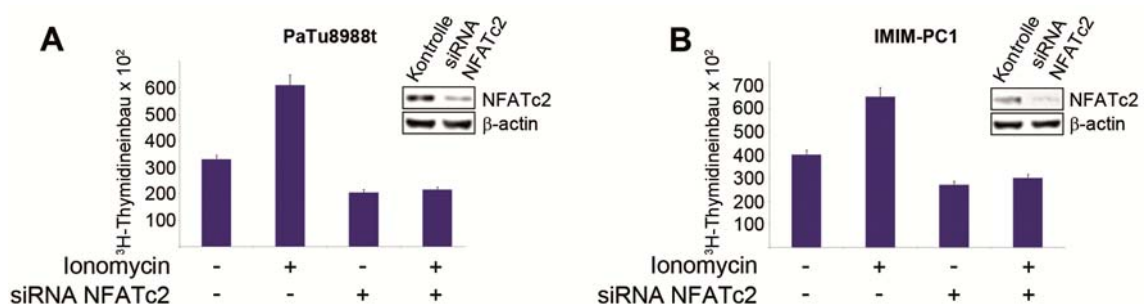


Abbildung 14: NFATc2-abhängige Proliferation von Pankreaskarzinomzellen. (A) PaTu8988t- und (B) IMIM-PC1-Zellen wurden mit siRNA gegen NFATc2 oder mit Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend mit 0,5 µM Ionomycin stimuliert. 24 h danach wurde der Einbau von ³H-Thyidin gemessen. Der erfolgreiche *knockdown* wurde durch Western Blot-Analysen bestätigt.

Weiterhin zeigten Thymidin-, bzw. Softagar-Assays, dass die stabile retrovirale Expression von NFATc2 in Suit007-Zellen ohne endogene NFATc2-Expression deutlich Proliferation sowie substratunabhängiges Wachstum steigert (Abb. 15).

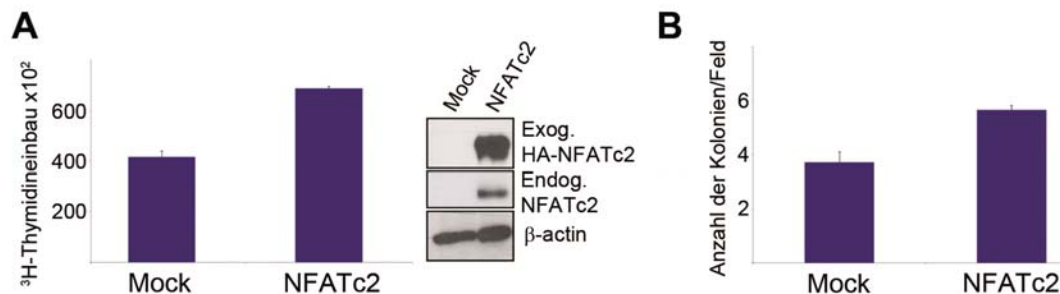


Abbildung 15: Funktionelle Auswirkungen einer stabilen NFATc2-Überexpression in Pankreaskarzinomzellen. **A.** Suit007-Zellen wurden stabil mit wt NFATc2 transfiziert und der ³H-Thymidineinbau gemessen. Die erfolgreiche Überexpression von wt NFATc2 wurde durch Western Blot-Analysen bestätigt. **B.** Suit007-Zellen mit stabiler NFATc2-Expression wurden in Triplikaten in 0,33% Agar/DMEM auf einem Bodennagar mit 0,5% Agar/DMEM ausgesät und die Anzahl der Kolonien wurde nach 10 Tagen in vier unterschiedlichen Feldern ausgezählt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Schließlich wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, um die Wachstumsregulation durch NFATc2 näher zu charakterisieren. Der *knockdown* von NFATc2 reduzierte die Expression von wichtigen Zellzyklusregulatoren wie CDK 4/6 und Cyclin D1/D3 deutlich (Abb. 16A). Andererseits führte die NFATc2-Überexpression in Suit007-Zellen zu einer Heraufregulation der genannten Zellzyklusproteine (Abb. 16B). Abschließend kann daraus gefolgert werden, dass NFATc2 im Gegensatz zu gesundem Gewebe im Pankreaskarzinom überexprimiert vorzufinden ist. Weiterhin ist der Calcineurin/NFATc2-Signalweg auch in Pankreaskarzinomzellen funktionell und stimuliert das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen.

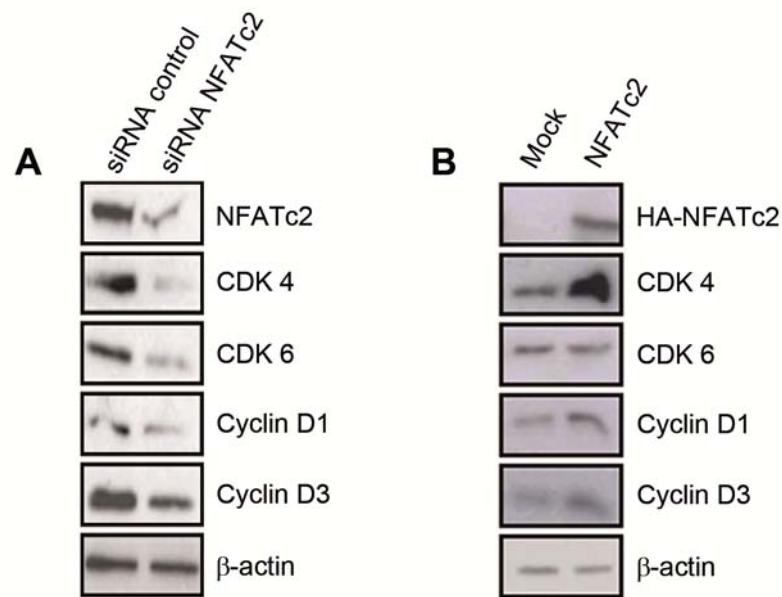


Abbildung 16: NFATc2-abhängige Regulation von Zellzyklusregulatoren. A. PaTu8988t-Zellen wurden mit siRNA gegen NFATc2 transfiziert und 24 h danach wurden Gesamtzelllysate hergestellt und im Western Blot auf die Expression von CDK 4/6 sowie Cyclin D1/D3 getestet. **B.** Suit007-Zellen mit stabiler wt NFATc2-Expression wurden auf die Expression von CDK 4/6 sowie Cyclin D1/D3 analysiert.

Um die Implikation des NFATc2-Signalweges in der GSK-3 β -modulierten Kontrolle des Zellwachstums zu untersuchen, wurden zunächst Lokalisationsstudien durchgeführt. Tatsächlich konnte eine gleichzeitige Expression von GSK-3 β und NFATc2 im Zellkern von humanen Pankreastumoren nachgewiesen werden (Abb. 17A). In PaTu8988t- und IMIM-PC1-Zellen waren weiterhin hohe Mengen an NFATc2 und GSK-3 β im Zellkern nachweisbar, wie der Western Blot in Abb. 17B zeigt.

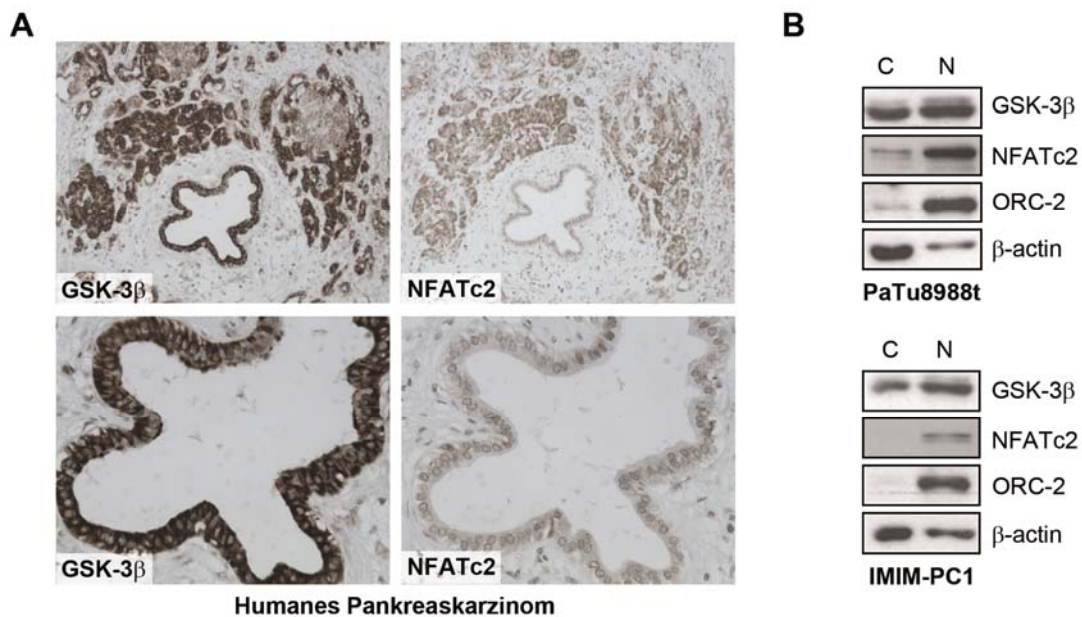


Abbildung 17: Analyse der NFATc2- und GSK-3β-Lokalisation in Pankreaskarzinomzellen.

A. Humane Pankreaskarzinomgewebeschnitte wurden mit GSK-3β, bzw. NFATc2-Antikörpern inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit DAB, im Anschluss wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Die oberen Abschnitte stellen 10-fache Vergrößerungen, die unteren Abschnitte 40-fache Vergrößerungen dar. **B.** Nukleäre (N) und cytoplasmatische (C) Lysate von IMIM-PC1- und PaTu8988t-Zellen wurden auf GSK-3β und NFATc2-Expression analysiert. ORC-2 diente als nukleäre Kontrolle und β-actin als cytoplasmatische Kontrolle.

Zur Analyse des Einflusses von GSK-3β auf die NFATc2-Aktivität wurden Luciferase-Reporterassays durchgeführt. Hierbei wurden PaTu8988t-Zellen mit einem artifiziellen, NFAT-responsiven Reporterkonstrukt transfiziert, welches drei hintereinander geschaltete NFAT-Bindungsstellen (cisNFAT) enthält. Danach wurden die Zellen mit AR-A behandelt. Überraschenderweise führte die Hemmung der NFAT-Exportkinase keine zunehmende NFATc2-Transaktivierung herbei, vielmehr wurde eine beachtliche Abnahme der Transaktivierung an cisNFAT beobachtet (Abb. 18A). Ähnliche Beobachtungen wurden nach genetischer Depletion von GSK-3β gemacht (Abb. 18B). Umgekehrt ging die Überexpression von c.a. GSK-3β mit einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität einher (Abb. 18C).

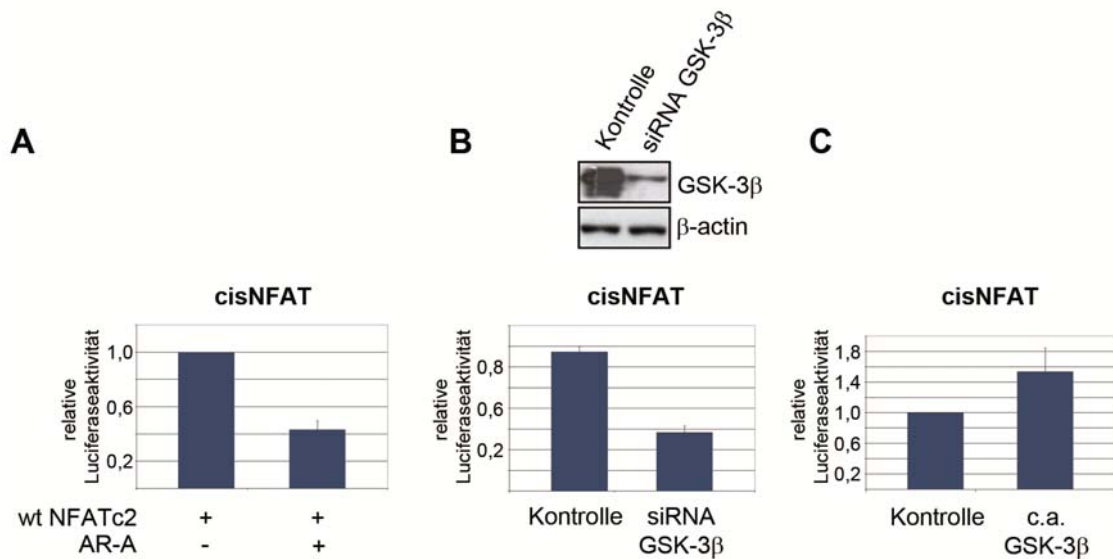


Abbildung 18: Luciferase-Reporterassays zur Analyse der GSK-3β-abhängigen NFATc2-Transaktivierung. **A.** IMIM-PC1-Zellen wurden mit einem artifiziellen, NFAT-responsiven Luciferase-Reporterkonstrukt, welches eine dreifache Wiederholung der NFAT-Bindungsstelle enthält (cisNFAT) sowie mit Renilla-Luciferase transfiziert. Zusätzlich wurde ein murines wt NFATc2-Expressionsplasmid transfiziert. 24 h danach wurden die Zellen für 6 h mit AR-A behandelt und die transkriptionelle Aktivität von NFATc2 wurde durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. **B.** PaTu8988t-Zellen wurden mit siRNA gegen GSK-3β und 24 h später mit cisNFAT sowie Renilla-Luciferase transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde die Transaktivierung durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. **C.** PaTu8988t-Zellen wurden mit dem Effektorplasmid c.a. GSK-3β sowie mit den Reporterplasmiden cisNFAT und Renilla-Luciferase transfiziert. 24 h danach wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Quotienten aus cisNFAT-Luciferasewert und Renilla-Luciferasewert \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um die GSK-3β-vermittelte Regulation von NFATc2 auf Proteinebene zu untersuchen, wurden PaTu8988t-Zellen zunächst ausgehungert und mit Ionomycin vorbehandelt, um den Ca^{2+} /Calcineurin-Signalweg zu aktivieren und folglich eine Translokation von NFATc2 in den Zellkern zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Behandlung mit ansteigenden AR-A-Konzentrationen und die Gesamtzelllysate wurden auf NFATc2-Expression analysiert. In Übereinstimmung mit den Daten aus den Reporterassays konnte ein konzentrationsabhängiger und erheblicher Expressionsverlust von NFATc2 festgestellt werden. Der Effekt einer AR-A-Behandlung auf die GSK-3β-Aktivität wurde durch Färbung auf p-Glykogensynthase, einem weiteren GSK-3β-Substrat, bestätigt (Abb. 19A). Zudem führte der genetische *knockdown* von GSK-3β ebenfalls zu einer Abnahme der NFATc2-Expression (Abb. 19B). Proteinlysate aus den IMIM-PC1-Xenograftgeweben nach AR-A-Behandlung

wurden im Weiteren auf die Expression von NFATc2 und p-Glykogensynthase überprüft. Auch *in vivo* führte der Verlust der GSK-3 β -Aktivität zu einer reduzierten NFATc2-Expression und Abnahme von p-Glykogensynthase, wie die Western Blots in Abb. 19C illustrieren.

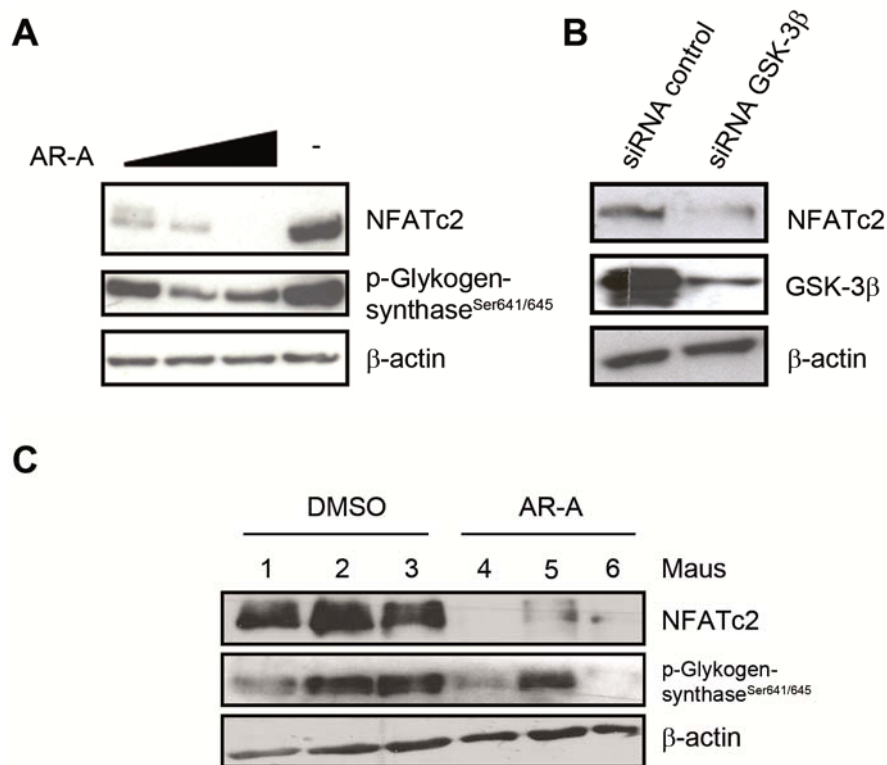


Abbildung 19: Expressionsanalysen von NFATc2 nach GSK-3 β -Inaktivierung *in vitro* und *in vivo*. **A.** PaTu8988t-Zellen wurden 16 h ausgehungert und 30 min mit 0,5 μ M Ionomycin vorbehandelt. Danach wurden sie 1 h mit 2,5, 25 und 50 μ M AR-A (in DMSO) behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden anschließend auf NFATc2- und p-Glykogensynthase-Expression analysiert. **B.** PaTu8988t-Zellen wurden mit siRNA gegen GSK-3 β transfiziert und die Zelllysate nach 48 h auf NFATc2- und GSK-3 β -Expression überprüft. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **C.** Aus IMIM-PC1-Tumorgewebe von drei repräsentativen Mäusen jeder Gruppe wurden Proteine isoliert und auf NFATc2- und p-Glykogensynthase-Expression gefärbt. β -actin diente als Ladekontrolle.

Im nächsten Experiment wurden PaTu8988t-Zellen nach Ionomycinvorbehandlung mit ansteigenden AR-A-Konzentrationen behandelt und einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Wie im Gesamtzelllysat konnte auch im Zellkern ein deutlicher konzentrationsabhängiger Expressionsverlust von NFATc2 bei gleichbleibender GSK-3 β -Expression nach AR-A-Gabe nachgewiesen werden (Abb. 20A). Um eine Translokation ins Cytoplasma durch AR-A auszuschließen, wurden nukleäre und cytoplasmatische Proteine von PaTu8988t- (Abb. 20B) und IMIM-PC1-Zellen (Abb. 20C) nach Ionomycin- und AR-A-Behandlung auf NFATc2-Expression getestet. Auch hier erfolgte eine Abnahme der NFATc2-Expression im Zellkern, während im Cytoplasma keine Veränderung erkennbar war.

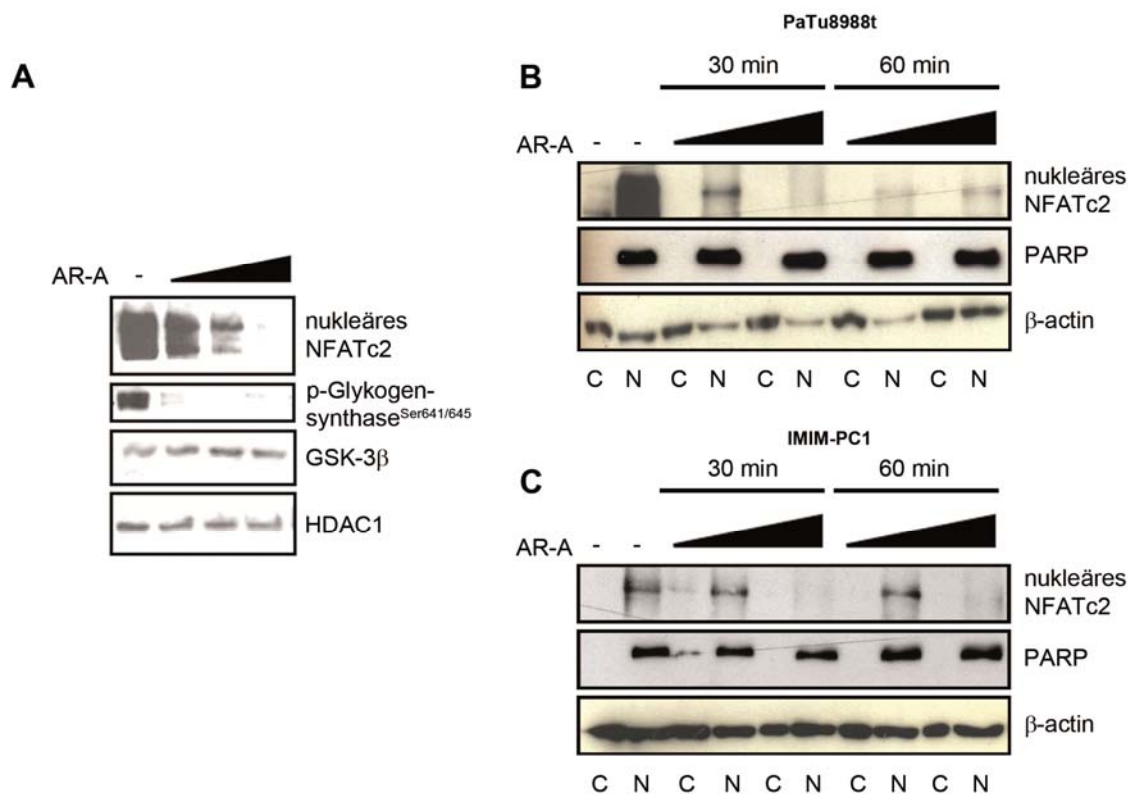


Abbildung 20: Subzelluläre Fraktionierung zur Lokalisierung des GSK-3 β -vermittelten Expressionsverlustes von NFATc2. **A.** PaTu8988t-Zellen wurden 16 h ausgehungert und 30 min mit 0,5 μ M Ionomycin vorbehandelt. Anschließend wurden sie 30 min mit 5, 25 und 50 μ M AR-A behandelt und einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Die nukleären Proteine wurden auf NFATc2-, p-Glykogensynthase- und GSK-3 β -Expression getestet. HDAC1 diente als Ladekontrolle. **B.** PaTu8988t-Zellen und **C.** IMIM-PC1-Zellen wurden 16 h ausgehungert und 30 min mit 0,5 μ M Ionomycin vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine Behandlung für 30 und 60 min mit 25 und 50 μ M AR-A und darauffolgend die Fraktionierung in cytoplasmatische © und nukleäre Proteine (N). Diese wurden mit NFATc2- und PARP-Antikörpern gefärbt. PARP diente hierbei als nukleäre Ladekontrolle, β -actin als cytoplasmatische Kontrolle.

Zur Unterscheidung, ob der beobachtete Verlust von NFATc2 durch einen Verlust der Proteinstabilität oder -synthese bedingt ist, wurden PaTu8988t-Zellen mit siRNA gegen GSK-3 β transfiziert und nach 24 h mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Proteinlysate hergestellt und auf NFATc2- und GSK-3 β -Expression geprüft. Der Verlust von GSK-3 β bedingte eine deutlich geringere Proteinstabilität von NFATc2 im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 21 links), wie auch durch die Quantifizierung der NFATc2-Expression verdeutlicht wird (Abb. 21 rechts).

Zusammenfassend konnte durch verschiedene Ansätze – eine pharmakologische und genetische Inaktivierung von GSK-3 β – gezeigt werden, dass der Verlust der GSK-3 β -Aktivität mit einer Destabilisierung des NFATc2-Proteins einhergeht. Dies ist assoziiert mit einer reduzierten transkriptionellen Aktivität.

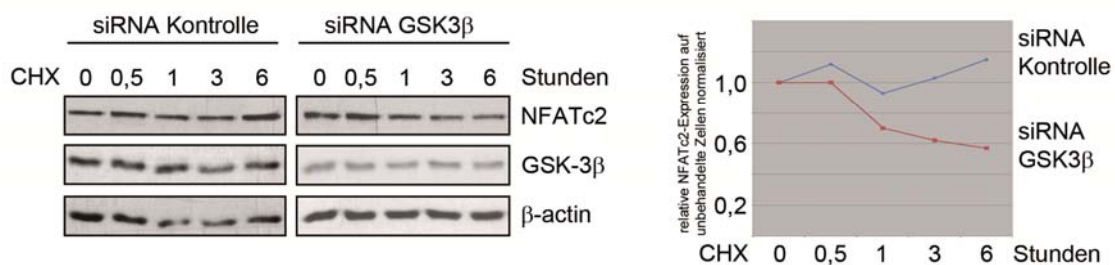


Abbildung 21: Stabilitätsassay nach GSK-3 β -Depletion. PaTu8988t-Zellen wurden mit siRNA gegen GSK-3 β transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 20 μ g/ml Cycloheximid (CHX) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Diese wurden anschließend auf die Expression von NFATc2 und GSK-3 β untersucht. Die Darstellung rechts zeigt die densitometrische Auswertung der NFATc2-Expressionsbanden. Die Werte wurden dabei jeweils auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert.

4.3 GSK-3 β phosphoryliert drei konservierte Serine in der SP2-Region und bewahrt NFATc2 somit vor einem raschen Proteinabbau

Durch Sequenzanalysen konnten drei Konsensusstellen für GSK-3 β in der SP2-Region der regulatorischen Domäne des NFAT-Proteins identifiziert werden (Abb. 22A). Dabei geht aus der Literatur hervor, dass GSK-3 β diese phosphoryliert, um den Export von NFAT-Proteinen aus dem Zellkern zu einzuleiten (Beals *et al.*, 1997; Gwack *et al.*, 2006). In vielen Fällen leitet die Phosphorylierung dieser sog. „*phospho degron sites*“ = GSK-3 β -Erkennungsstellen die Degradation des entsprechenden Proteins (z.B. Cyclin D1, c-jun, β -Catenin) ein (Doble und Woodgett, 2003). Im Folgenden wurden PaTu8988t-Zellen mit stabiler Expression eines murinen HA-wt NFATc2-Konstruktes mit AR-A behandelt und mit einem Antikörper für p-NFATc2^{SP2} gefärbt, welcher spezifisch die Phosphorylierung der drei Serine in der SP2-Region erkennt. Die AR-A-Behandlung bewirkte zunächst auch bei exogener Überexpression von NFATc2 einen Expressionsverlust. Weiterhin zeigt die Quantifizierung des pNFAT/NFAT-Verhältnisses in Abb. 22B, dass die GSK-3 β -Inhibition die Phosphorylierung an SP2 relativ zu Gesamt-NFATc2 deutlich reduziert. Ferner wurden PaTu8988t-Zellen mit stabiler Expression des c.a. GSK-3 β -Proteins auf p-NFATc2^{SP2} und NFATc2-Expression analysiert. Umgekehrt war hier bei Betrachtung des pNFAT/NFAT-Verhältnisses eine deutliche Zunahme der SP2-Phosphorylierung erkennbar (Abb. 22C). Der Einfluss der AR-A-Behandlung auf die Phosphorylierung der SP2-Region *in vivo* konnte nicht eindeutig beurteilt werden, da das pNFAT/NFAT-Verhältnis in den DMSO-Tumoren – je nachdem, welche Tumoren miteinander verglichen wurden – sehr heterogen war. Zudem konnte in zwei Proben nach AR-A-Behandlung keine NFAT-Expression mehr detektiert werden, was eine Beurteilung der pNFAT-Abnahme zusätzlich erschwert (Abb. 22D).

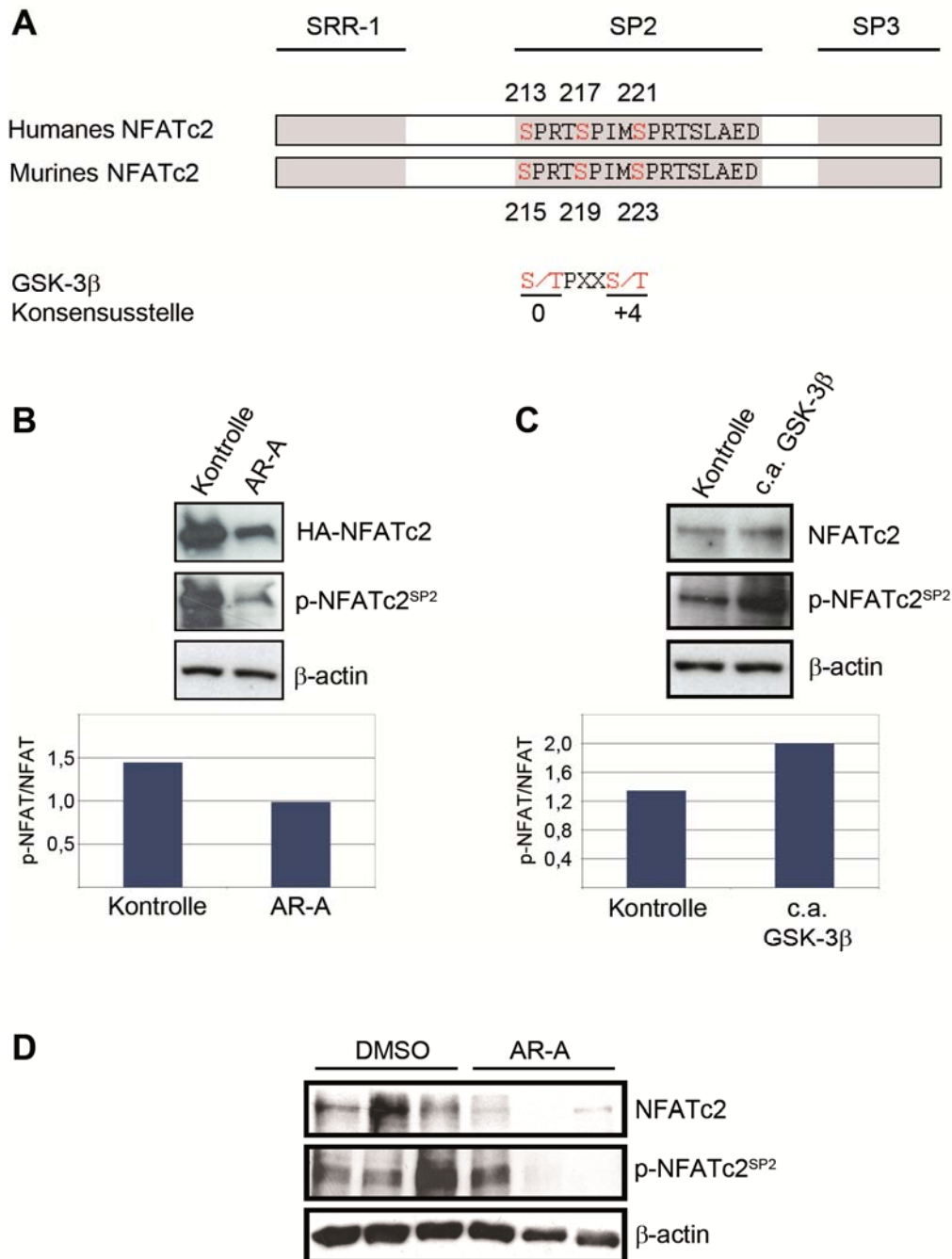


Abbildung 22: Identifikation von GSK-3β-Phosphorylierungsstellen. **A.** Ausschnitt der regulatorischen N-terminalen Domäne des humanen und murinen NFATc2-Proteins. Sequenzanalysen enthüllen drei GSK-3β-Konsensusstellen (S/TPXXS/T) in der SP2-Region. **B.** Stabile HA-wt NFATc2-exprimierende PaTu8988t-Zellen wurden 24 h mit AR-A behandelt und die Gesamtzelllysate wurden in Western Blot-Analysen mit p-NFATc2-, HA- und β-actin-Antikörpern inkubiert. Die darunterliegende Grafik stellt die Quantifizierung der p-NFATc2- und NFATc2-Expression nach AR-A-Behandlung dar. Angegeben ist das Verhältnis pNFAT/NFAT. **C.** Lysate von stabilen c.a. GSK-3β-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen wurden auf p-NFATc2- und NFATc2-Expression analysiert. Die Grafik unten zeigt die Quantifizierung der NFATc2- und p-NFATc2-Expression. Angegeben ist das pNFAT/NFAT-Verhältnis. **D.** Lysate der IMIM-PC1 Xenograft-Tumorgewebe wurden auf p-NFATc2 und NFATc2-Expression getestet.

In immunhistologischen Färbungen konnte jedoch eine generelle Abnahme von p-NFATc2 nach AR-A Behandlung *in vivo* verzeichnet werden (Abb. 23). Folglich vermittelt GSK-3 β eine regulierbare Phosphorylierung der drei konservierten Serine 213, 217 und 221 in der SP2-Region des NFATc2-Proteins.

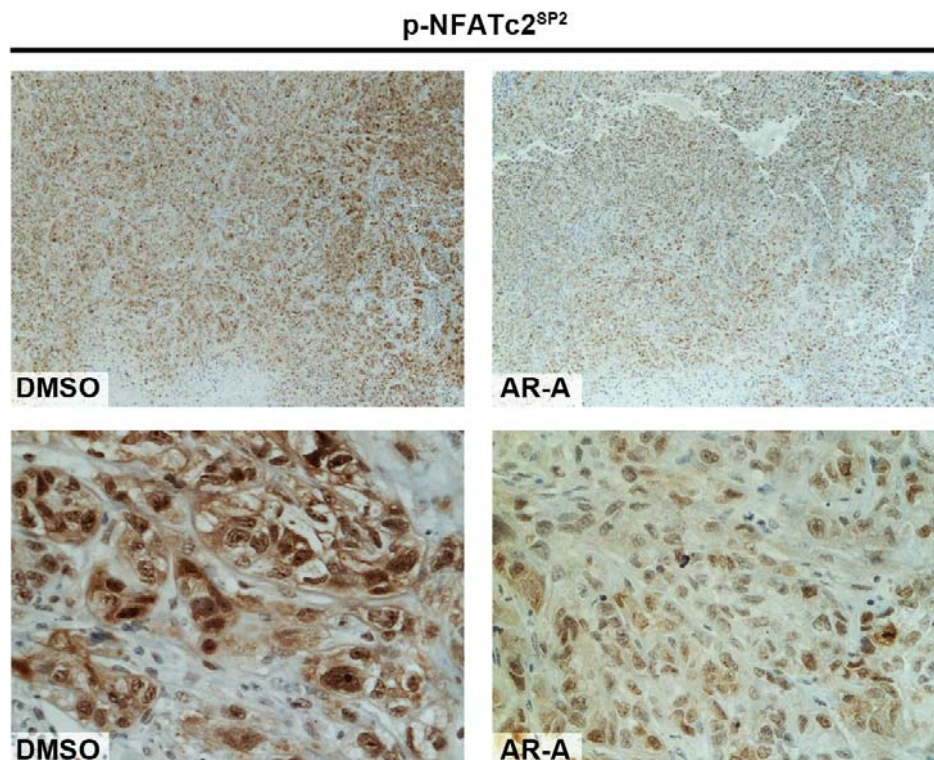


Abbildung 23: Immunhistologische Färbung der IMIM-PC1-Xenograftgewebe auf p-NFATc2. IMIM-PC1-Xenograftgewebe nach DMSO-/AR-Behandlung wurden mit einem p-NFATc2-Antikörper gefärbt. Zur Visualisierung diente DAB, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die oberen Abbildungen zeigen 10-fache, die unteren 40-fache Vergrößerungen.

Zur Analyse der Bedeutung des GSK-3 β -regulierten Phosphorylierungsstatus für die Stabilität des NFATc2-Proteins wurden mehrere Punktmutationen in die SP2-Region des NFATc2-Expressionskonstruktes eingeführt. Einerseits wurden die Serine mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanin ausgetauscht, um ein nicht-phosphorylierbares Konstrukt herzustellen (im Folgenden Δ SP2). Andererseits wurden die Alanine des NFATc2 Δ SP2-Konstruktes durch Glutamat, bzw. Aspartat ausgetauscht, um eine konstitutive Phosphorylierung der SP2-Region nachzuahmen (im Folgenden pSP2; Abb. 24A). Die Konstrukte

wurden zunächst in PaTu8988t-Zellen transfiziert und nach 24 h wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Daraufhin wurde HA-NFATc2 mit einem HA-Antikörper immunpräzipitiert und im Western Blot auf p-NFATc2^{SP2} gefärbt. Ein p-NFATc2-Signal war nur in der wt NFATc2-Spur sichtbar, da die Phosphorylierungsstellen in NFATc2 Δ SP2/pSP2 durch Mutationen entfernt wurden (Abb. 24B). Nachfolgend wurden Stabilitätsassays durchgeführt. Dazu wurden PaTu8988t-Zellen mit den drei Expressionskonstrukten transfiziert und nach 24 h mit CHX behandelt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Gesamtzelllysate hergestellt und auf die Expression von HA-NFATc2 geprüft (Abb. 24C). Die Phosphorylierung der SP2-Region korrelierte tatsächlich mit der Proteinstabilität. NFATc2 Δ SP2 unterlag dabei einer raschen Destabilisierung, während wt NFATc2 und NFATc2 pSP2 über einen Zeitraum von 9 h stabil blieben, wie die Quantifizierung in Abb. 24D rechts veranschaulicht.

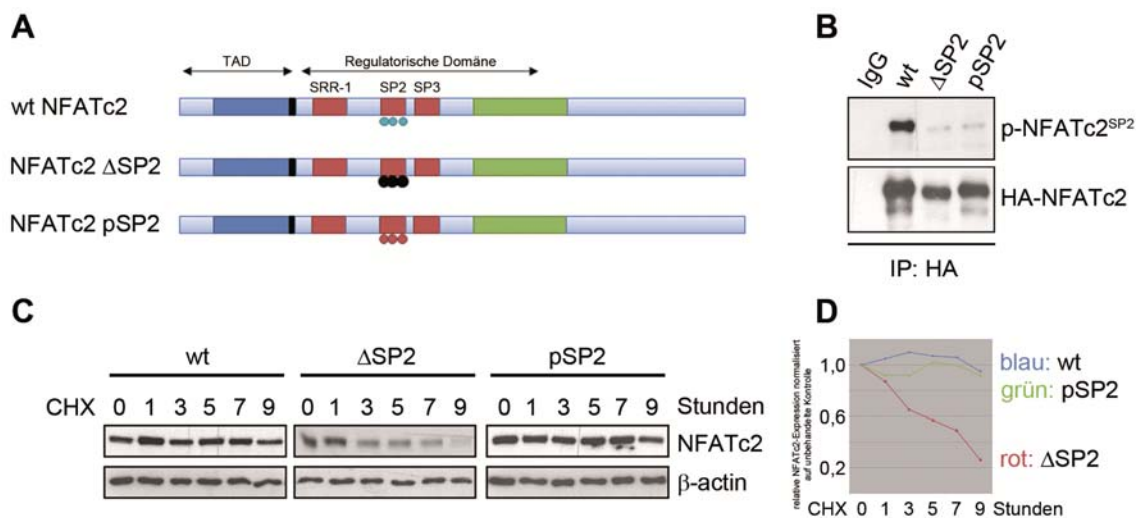


Abbildung 24: Charakterisierung der Bedeutung der SP2-Phosphorylierung für die Stabilität von NFATc2. **A.** Darstellung der regulatorischen Domäne im murinen NFATc2-Expressionskonstrukt sowie der eingeführten Punktmutationen in der SP2-Region. Das nicht-phosphorylierbare NFATc2 Δ SP2-Konstrukt wurde hierbei durch den Austausch der Serine durch Alanin hergestellt. Die Nachahmung einer konstitutiven Phosphorylierung wurde durch einen Austausch der Alanine im Δ SP2-Konstrukt durch Glutamat/Aspartat bewirkt. **B.** PaTu8988t-Zellen wurden mit den NFATc2-Expressionskonstrukten wt NFATc2, NFATc2 Δ SP2 und pSP2 transfiziert. 24 h später erfolgte eine Immunpräzipitation (IP) von HA-NFATc2 und eine Immunoblotanalyse auf p-NFATc2^{SP2}. **C.** PaTu8988t-Zellen wurden mit den wt NFATc2, NFATc2 Δ SP2 und pSP2-Expressionskonstrukten transfiziert und 24 h danach mit 20 μ g/ml CHX behandelt. Nach den angegebenen Zeitpunkten erfolgten die Herstellung von Proteinlysaten und Analyse auf HA-NFATc2-Expression. **D.** Densitometrische Auswertung der NFATc2-Expressionsbanden, dargestellt als normalisierte Werte zu den unbehandelten Kontrollen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zur Bestätigung eines beschleunigten nukleären Verlustes von NFATc2 Δ SP2 nach Hemmung der Proteinsynthese wurden PaTu8988t-Zellen erneut mit den drei Expressionskonstrukten transfiziert und für 4,5 h und 9 h mit CHX behandelt. In Immunfluoreszenzanalysen wurden die NFATc2-Konstrukte dann mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern visualisiert. Tatsächlich konnte schon nach 4,5 h CHX-Behandlung eine deutliche Abnahme von Δ SP2 im Zellkern beobachtet werden. Der Wildtyp nahm im Zellkern nach 9 h leicht ab, während NFATc2 pSP2 auch über diesen Zeitraum stabil blieb (Abb. 25).

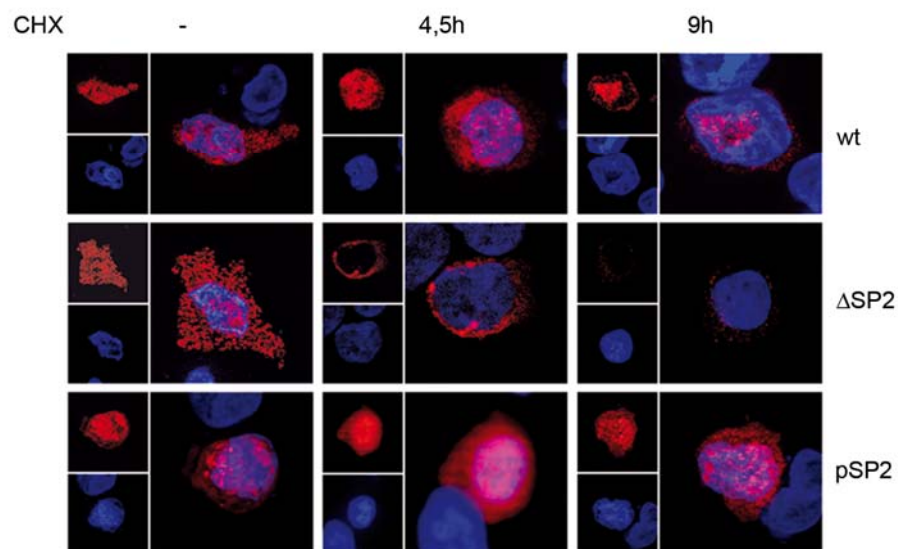


Abbildung 25: Immunfluoreszenzanalysen nach CHX-Behandlung. PaTu8988t-Zellen wurden mit wt NFATc2, NFATc2 Δ SP2 und pSP2 transfiziert und 4,5 h, bzw. 9 h mit 20 μ g/ml CHX behandelt. Danach fand eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd und die Inkubation mit HA-Antikörpern statt. Die Visualisierung erfolgte mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die NFATc2-Konstrukte sind in rot und die Zellkerne in blau dargestellt.

Um die Beteiligung des 26s-Proteasoms in der Destabilisierung des nicht-phosphorylierbaren NFATc2 Δ SP2 zu ermitteln, wurden PaTu8988t-Zellen mit wt NFATc2 und NFATc2 Δ SP2 transfiziert und 6 h mit 20 μ M MG132, einem Proteasominhibitor, sowie mit 20 μ g/ml CHX inkubiert. Die Gesamtzelllysate wurden nachfolgend auf HA-NFATc2-Expression analysiert. Der Verlust von NFATc2 Δ SP2 konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit MG132 verhindert

werden, was auf eine erhöhte Proteolyse von NFATc2 Δ SP2 durch das 26s Proteasom hinweist (Abb. 26).

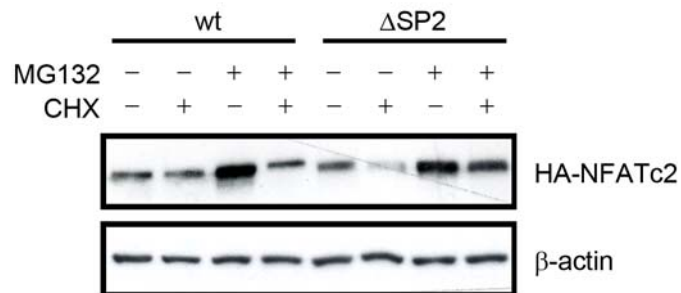


Abbildung 26: Die Dephosphorylierung der SP2-Domäne geht mit einem verstärkten proteosmalen Abbau von NFATc2 einher. PaTu8988t-Zellen wurden mit wt NFATc2 und NFATc2 Δ SP2 transfiziert. 24 h danach wurden sie 6 h mit 20 μ M MG132 und 20 μ g/ml CHX behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden im Western Blot mit einem HA-Antikörper inkubiert. β -actin diente als Ladekontrolle.

Im darauffolgenden Experiment wurden PaTu8988t-Zellen transient mit wt NFATc2 und NFATc2 pSP2 transfiziert und mit AR-A behandelt. In Übereinstimmung mit den vorherigen Beobachtungen war das NFATc2 pSP2-Konstrukt nach AR-A-Behandlung resistent gegen einen Abbau (Abb. 27A). Auch die stabile Überexpression von NFATc2 pSP2 bewirkte eine Resistenz gegen einen Proteinabbau nach GSK-3 β -Depletion (Abb. 27B). Die in Abb. 27 unten dargestellten Grafiken illustrieren die densitometrischen Auswertungen des Verhältnisses NFATc2/p-NFATc2.

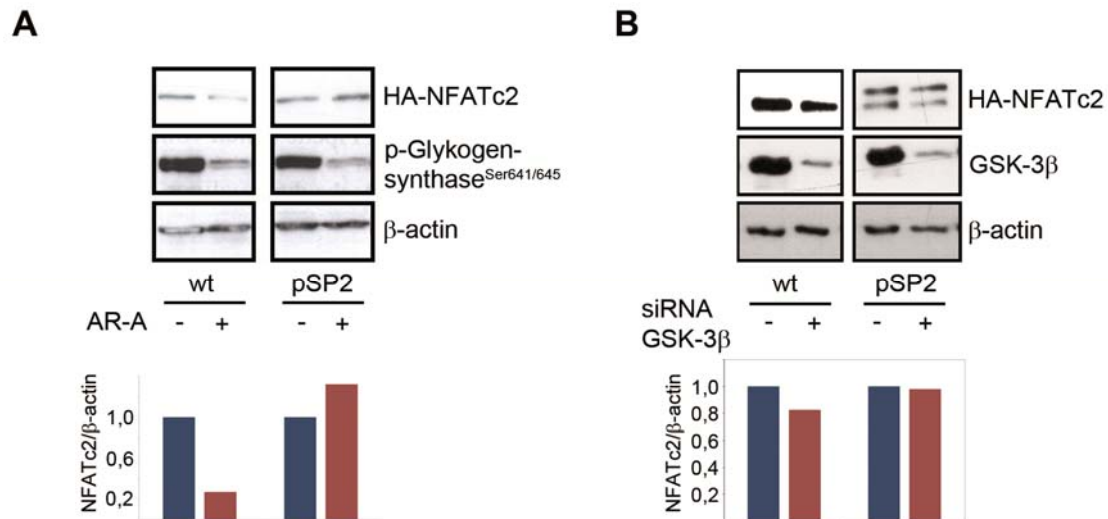


Abbildung 27: Die konstitutive Phosphorylierung der SP2-Domäne bewirkt eine Resistenz gegen den GSK-3 β -abhängigen Abbau. **A.** PaTu8988t-Zellen wurden mit wt NFATc2 und NFATc2 pSP2 transfiziert und nach 24 h für weitere 24 h mit 25 μ M AR-A behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden auf HA- und p-Glykogensynthase-Expression überprüft. **B.** Stabile PaTu8988t-Zellen wurden mit siRNA gegen GSK-3 β transfiziert und 48 h danach wurden die Lysate in Western Blot-Analysen auf HA- und GSK-3 β -Expression getestet (oben). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet, angegeben ist das NFATc2/ β -actin-Verhältnis. β -actin diente dabei als Ladekontrolle. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente.

Im Zellkern von stabilen wt NFATc2 und NFATc2 pSP2-exprimierenden Suit028-Zellen konnte ebenfalls ein deutlicher Abbau von wt NFATc2 nach AR-A bestätigt werden, während NFATc2 pSP2 nicht betroffen war (Abb. 28). Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass die GSK-3 β -vermittelte Phosphorylierung der SP2-Domäne mit einer erhöhten Stabilität des NFATc2-Proteins einhergeht.

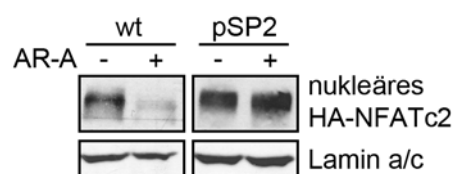


Abbildung 28: Nukleäre Expression von NFATc2 nach AR-A-Behandlung. Suit028-Zellen mit stabiler wt NFATc2- und NFATc2 pSP2-Expression wurden 3 h mit AR-A behandelt. Die Kernlysate wurden im Western Blot auf HA-NFATc2-Expression getestet. Lamin a/c diente als nukleäre Ladekontrolle.

4.4 Die GSK-3 β -NFATc2-Kooperation verstärkt die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo*

Frühere Erkenntnisse beschreiben, dass GSK-3 β durch Phosphorylierung der SP2-Region den nukleären Export von NFATc2 begünstigt sowie die DNA-Bindung terminiert (Beals *et al.*, 1997; Neal und Clipstone, 2001). Welche funktionelle Relevanz hat demnach die konstitutive Phosphorylierung der SP2-Region? Um dies zu eruieren, wurden zunächst humane Pankreastumorgewebe mit dem p-NFATc2^{SP2}-Antikörper gefärbt. Nachweislich befanden sich hohe Mengen an p-NFATc2^{SP2} im Zellkern der Karzinomzellen (Abb. 29).

Humanes Pankreaskarzinom

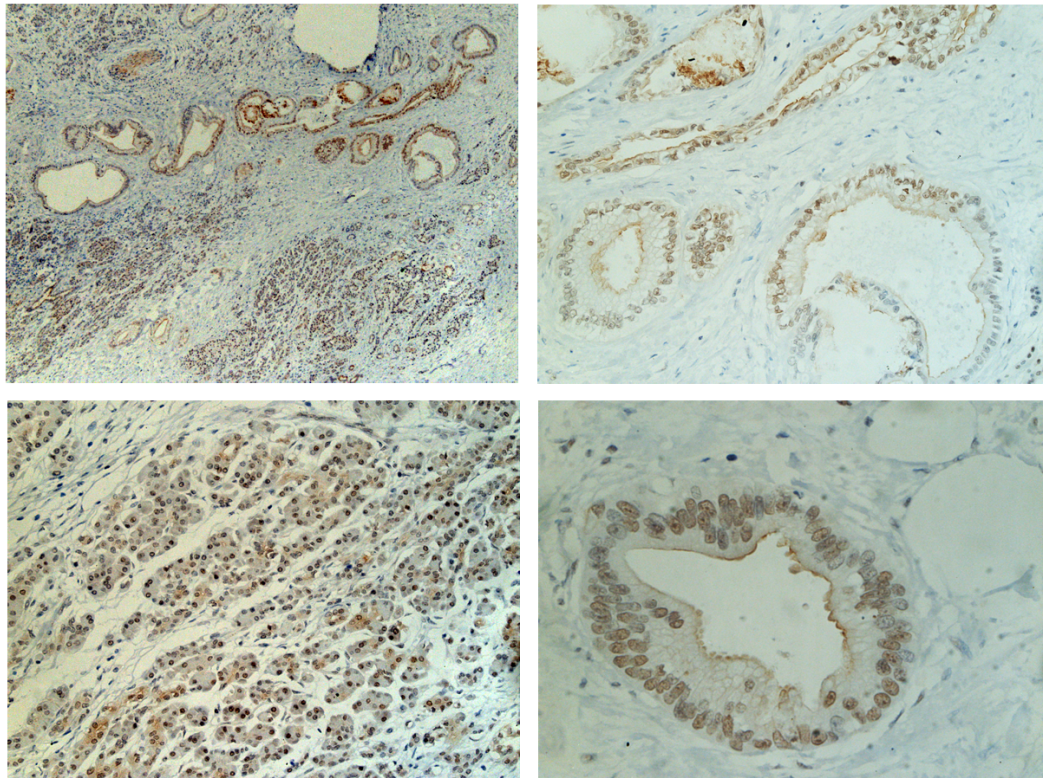


Abbildung 29: Immunhistologische Analyse der p-NFATc2^{SP2}-Lokalisation. Humane Pankreastumorgewebe wurden mit einem pNFAT^{SP2}-Antikörper auf die Lokalisation und Expression untersucht. Die Visualisierung erfolgte mit DAB, die Abbildungen zeigen 10x Vergrößerungen (oben links), bzw. 20x Vergrößerung (oben rechts und unten links) und 40x Vergrößerungen (unten rechts) der ersten 10x Übersichtsabbildung.

DNA-Pulldownassays sollten ferner prüfen, ob konstitutiv phosphoryliertes NFATc2 tatsächlich an die NFAT-Konsensusstelle der DNA bindet. Hierzu wurden Oligonukleotide mit der NFAT-DNA-Bindungssequenz mit nukleären Proteinlysaten stabiler wt NFATc2 und NFATc2 pSP2-Zellen inkubiert. Die präzipitierten DNA-Sequenzen mit den daran gebundenen Proteinen wurden mittels Streptavidin-gekoppelten *Beads* aus dem Lysat isoliert. Anschließende Western Blot-Analysen belegten, dass NFATc2 pSP2 deutlich im Zellkern exprimiert wird und im Vergleich zu wt NFATc2 sogar mit leicht erhöhter Intensität an die NFAT-DNA-Bindungsstelle bindet (Abb. 30A). Weiterhin wurde die transkriptionelle Aktivität und Aktivierbarkeit durch Calcineurin im Luciferase-Reporterassay verglichen. Dazu wurden stabile PaTu8988t-Zellen mit einem Calcineurin-Expressionskonstrukt sowie mit cisNFAT transfiziert. Ähnlich zu den DNA-Pulldownassays wies NFATc2 pSP2 verglichen mit wt NFATc2 eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität auf, welche durch eine zusätzliche Calcineurinexpression noch weiter induzierbar war (Abb. 30B).

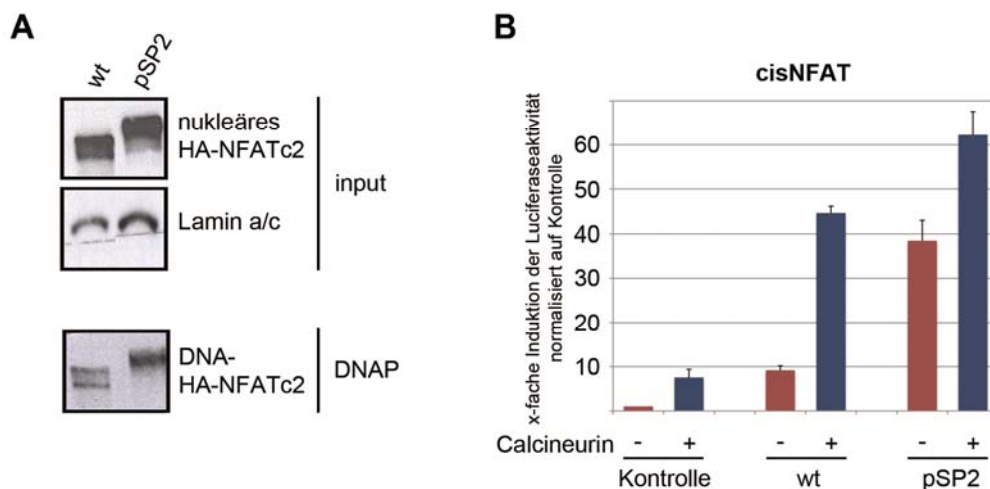


Abbildung 30: Funktionelle Auswirkung der konstitutiven NFATc2-Phosphorylierung an der SP2-Region. **A.** Nukleäre Lysate stabiler Suit007-Zelllinien wurden mit Oligonukleotiden der NFAT-DNA-Bindungssequenzen inkubiert. Danach wurden an DNA-gebundene NFATc2-Proteine mit Streptavidin-Agarose-*Beads* herausgezogen und im Western Blot auf die Expression von DNA-gebundenem NFATc2 untersucht. Lamin a/c diente als nukleäre Ladekontrolle. **B.** Stabile PaTu8988t-Zellen wurden mit Calcineurin, cisNFAT sowie mit einer Renilla-Luciferase transfiziert. Nach 24 h wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Angegeben ist die x-fache Induktion der Aktivität \pm SD normalisiert auf die Kontrolle (erster roter Balken).

Die funktionellen Auswirkungen der stabilen Überexpression eines Abbauresistenten NFATc2 pSP2-Konstruktes wurden außerdem in Proliferationsstudien ermittelt. Die stabile Überexpression des wt NFATc2-Konstruktes ging dabei mit einem 1,6-fach erhöhtem ^3H -Thymidineinbau einher, während die stabile Überexpression des NFATc2 pSP2-Plasmids die Proliferation noch weiter verstärkte, wie in Abb. 31A dargestellt ist. Die Zellen wurden schließlich subkutan in athymische Nacktmäuse injiziert und das Wachstum der Tumoren wurde wöchentlich verfolgt. Nach vier Wochen wiesen PaTu898t wt NFATc2-Zellen im Vergleich mit den mock-Zellen leicht erhöhte Tumorumfänge auf, während die Volumina von NFATc2 pSP2-Zellen sich verdoppelt hatten (Abb. 31B). Schlussfolgernd verstärkt die Phosphorylierung der SP2-Region die NFATc2-Aktivität sowie die DNA-Bindung. Dies äußert sich in einem gesteigerten Tumorstadium *in vitro* und *in vivo*.

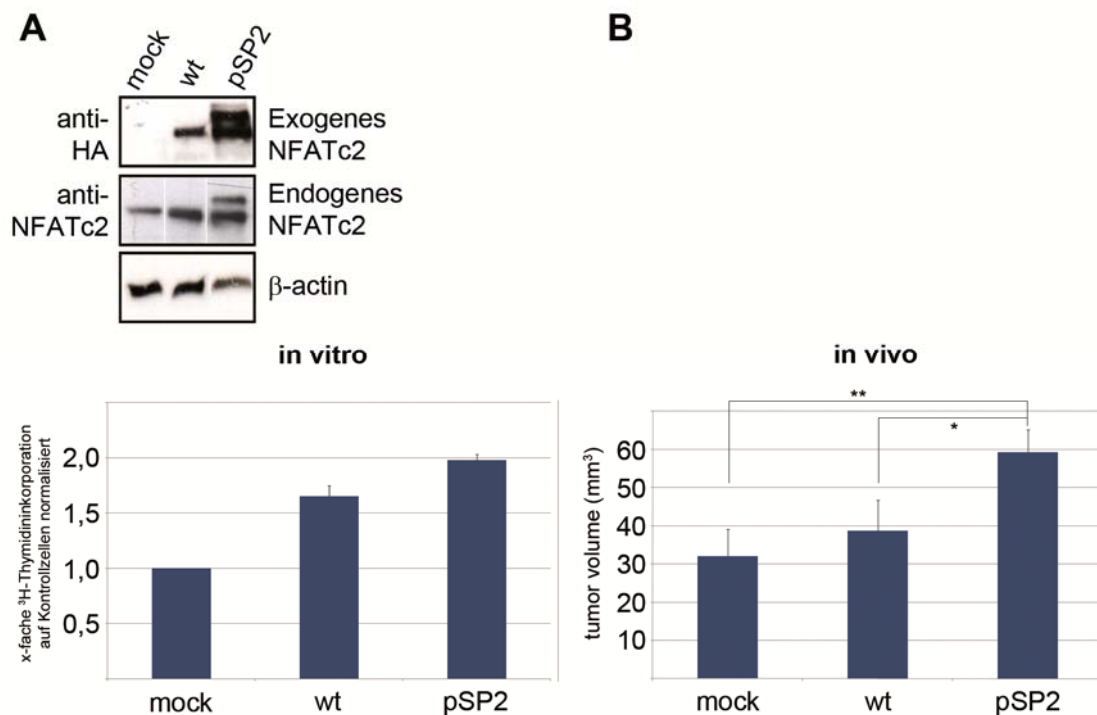


Abbildung 31: Wachstumsverhalten von stabil transfizierten Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* und *in vivo*. **A.** Der ^3H -Thymidineinbau von PaTu898t-Zellen mit stabiler wt NFATc2- und NFATc2 pSP2-Überexpression wurde 24 h nach Zellaussaat bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD als x-fache Proliferation der Kontrollzellen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **B.** Nu/nu immundefiziente Nacktmäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln) wurden subkutan mit 1×10^6 PaTu898t-Zellen mit stabiler mock, wt NFATc2 und NFATc2 pSP2-Überexpression beimpft. Die Tumorumfänge wurden einmal wöchentlich gemessen, die Berechnung erfolgte mit der Formel ($\pi \times 4/3 \times \text{Länge}/2 \times \text{Breite}/2 \times \text{Höhe}/2$). Angegeben sind Mittelwerte der Volumina nach 4 Wochen \pm SE. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem ungepaarten, einseitigen t-Test. $p = 0,008$; $p = 0,036$.

4.5 Die konstitutive SP2-Phosphorylierung ist nicht ausreichend für die Stabilisierung der GSK-3 β -abhängigen NFATc2-Aktivität

Im folgenden Experiment wurden stabile PaTu8988t-Zellen mit 25 μ M AR-A behandelt und auf die Responsivität im Proliferationsassay überprüft. Die Überexpression von wt NFATc2 in den „NFATc2-defizienten“ Suit028 Zellen antagonisierte die Proliferationshemmung nach AR-A Zugabe deutlich. Dieser „rescue“- Effekt konnte durch die Überexpression des stabilen pSP2-Konstruktes jedoch nicht verstärkt werden (Abb. 32).

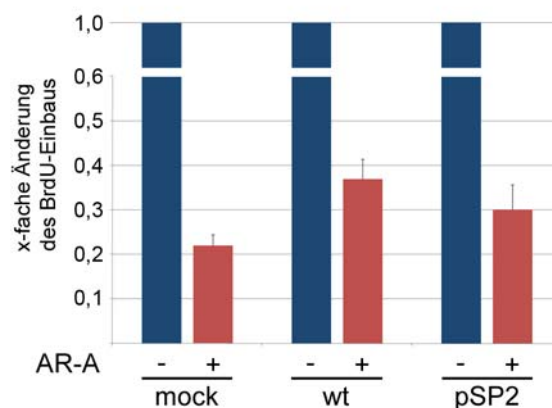


Abbildung 32: Proliferation von Pankreaskarzinomzellen mit stabiler Expression der NFATc2-Konstrukte nach AR-A-Behandlung. Stabile Suit028-Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit 25 μ M AR-A behandelt. 24 h danach wurde der BrdU-Einbau gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen von zwei unabhängigen Experimenten \pm SE relativ zu den unbehandelten Kontrollen.

Die gesteigerte Proteinstabilität des NFATc2 pSP2-Konstruktes kann die Tumorzellen demzufolge nicht vor einer AR-A-vermittelten Proliferationshemmung bewahren. Daher wurde vermutet, dass GSK-3 β die NFAT-Aktivität unabhängig von deren Einfluss auf die Proteinstabilität reguliert und dadurch einen zusätzlichen wesentlichen Einfluss auf das NFAT-vermittelte Tumorstadium nimmt. Um dies näher zu erforschen wurden stabile PaTu8988t-Zellen entweder 6 h mit AR-A behandelt, mit siRNA gegen GSK-3 β oder mit c.a. GSK-3 β transfiziert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die GSK-3 β -Aktivität korrelierte dabei deutlich mit der transkriptionellen Aktivität aller NFATc2-Konstrukte, wie in Abb. 33A, B und C dargestellt ist. GSK-3 β

vermittelt folglich einen von der SP2-Phosphorylierung und Proteinstabilität unabhängigen, stabilisierenden Effekt auf die NFATc2-Aktivität.

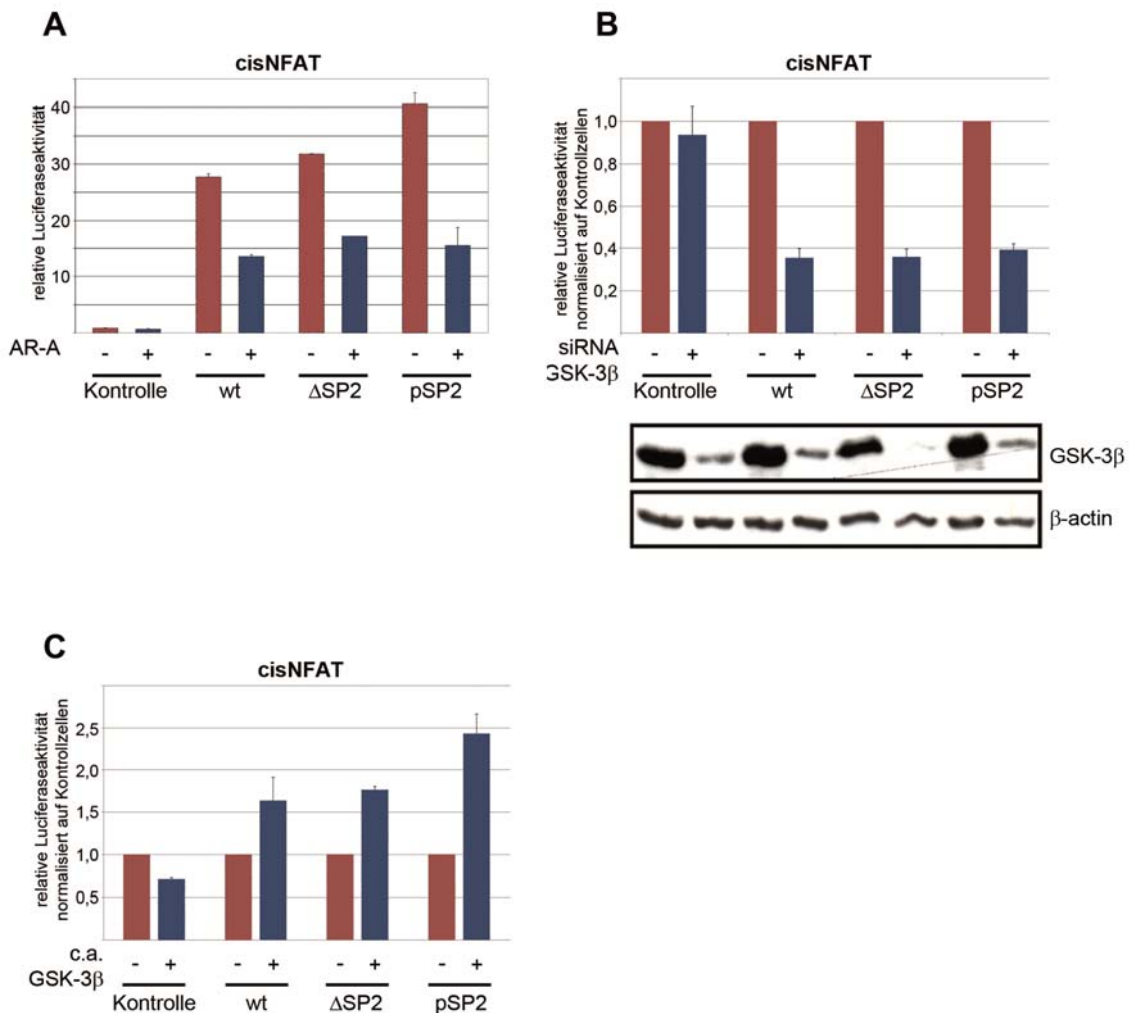


Abbildung 33: Analyse der GSK-3β-abhängigen transkriptionellen Aktivität der verschiedenen NFATc2-Konstrukte. **A.** PaTu8988t-Zellen wurden mit den angegebenen NFATc2-Konstrukten sowie mit cisNFAT transfiziert, nach 24 h für 6 h mit 25 μM AR-A behandelt und einer Luciferase-Aktivitätsmessung unterzogen. **B.** Stabile PaTu8988t-Zellen wurden mit siRNA gegen GSK-3β transfiziert und nach 24 h mit cisNFAT und Renilla-Luciferase transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde die Aktivität der Luciferase bestimmt. Angegeben ist die x-fache Aktivitätsänderung normalisiert auf die Kontrollen (oben). Der erfolgreiche *knockdown* wurde im Western Blot überprüft (unten). **C.** Stabile PaTu8988t-Zellen wurden mit c.a. GSK-3β oder einem Kontrollvektor transfiziert und nach 24 h auf die Luciferaseaktivität untersucht. Angegeben ist die x-fache Induktion der Aktivität normalisiert auf die Kontrollen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.6 GSK-3 β stabilisiert einen NFATc2-STAT3-Transkriptionskomplex im Zellkern und induziert dadurch die NFATc2-Aktivität

Die Eigenschaften von NFAT-Proteinen als Transkriptionsfaktoren werden maßgeblich durch die Auswahl der Partnerproteine bestimmt. So wurde im Folgenden angenommen, dass GSK-3 β die Interaktion mit Partnerproteinen moduliert und damit eine Auswirkung auf die NFATc2-Aktivität hat. Viele Studien konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor „*signal transducer and activator of transcription 3*“ (STAT3) einen bedeutenden Einfluss auf Tumorwachstum und maligne Transformation nimmt. So trägt dieser auch zum malignen Phänotyp im Pankreaskarzinom bei (Scholz *et al.*, 2003). Weiterhin bestehen Hinweise auf regulatorische Einflüsse von GSK-3 β auf die STAT3-Aktivität (Beurel und Jope, 2008; Beurel *et al.*, 2010) sowie Zusammenhänge zwischen NFAT und STAT3 in der neoplastischen Transformation (Lagunas und Clipstone, 2009). Immunhistologische Färbungen humaner Pankreastumorgewebe bewiesen zunächst eine deutliche Co-Lokalisation von HA-NFATc2 (braun) und STAT3 (grün) im Zellkern (Abb. 34).

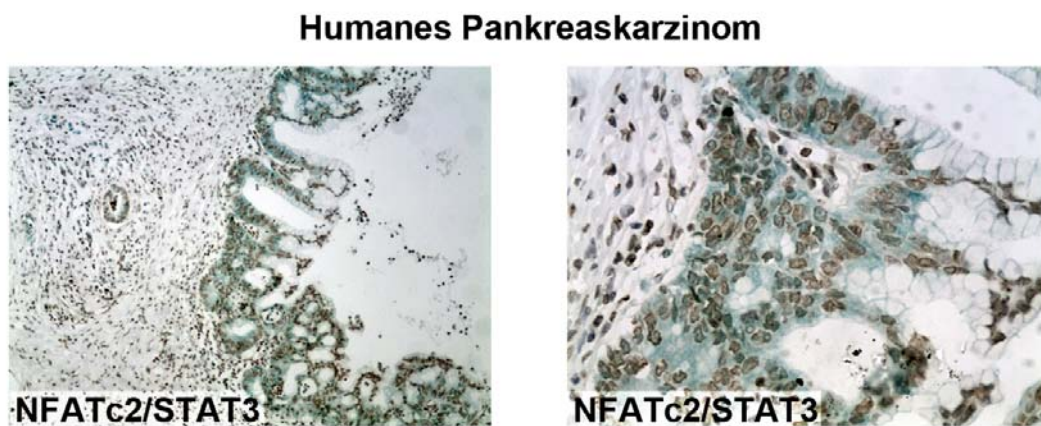


Abbildung 34: Co-Lokalisationsstudien in humanen Pankreastumorgeweben. Humane Pankreastumorgewebeschnitte wurden zunächst mit einem NFATc2 Antikörper inkubiert und mit DAB visualisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem STAT3-Antikörper und eine Visualisierung mit Histo®Green (Linaris GmbH). Hämalaun diente zur Gegenfärbung. Die linke Abbildung stellt eine 10-fache, die rechte eine 40-fache Vergrößerung dar.

Der Aktivierung des kanonischen STAT3-Signalwegs wird hauptsächlich durch die Phosphorylierung des C-terminalen Tyr705 (Y705) vermittelt, was im Gegenzug die Dimerisierung von STAT3, dessen Translokation in den Zellkern und schließlich die DNA-Bindung begünstigt (Aaronson und Horvath, 2002). Im folgenden Experiment wurden Zellen mit stabiler wt NFATc2-Überexpression nach Serumentzug bzw. in Serum mit Interleukin-6 (IL-6) stimuliert, um eine Y705-Phosphorylierung von STAT3 zu induzieren. Anschließend wurde HA-NFATc2 immunpräzipitiert und die Präzipitate wurden auf STAT3-Bindung getestet. Die Interaktion zwischen NFATc2 und STAT3 wurde durch Serum stimuliert (Abb. 35, Spur 2 und 4). Die Funktion von STAT3 als Transkriptionsfaktor war offensichtlich nicht essentiell, da die Bindung zwischen NFATc2 und STAT3 in Serum unabhängig vom STAT3-Phosphorylierungszustand an Y705 erfolgte (Abb. 35, Spur 4 und 5). Nichtsdestoweniger wurde die Interaktion durch die IL-6-vermittelte Y705-Phosphorylierung verstärkt (Spur 5).

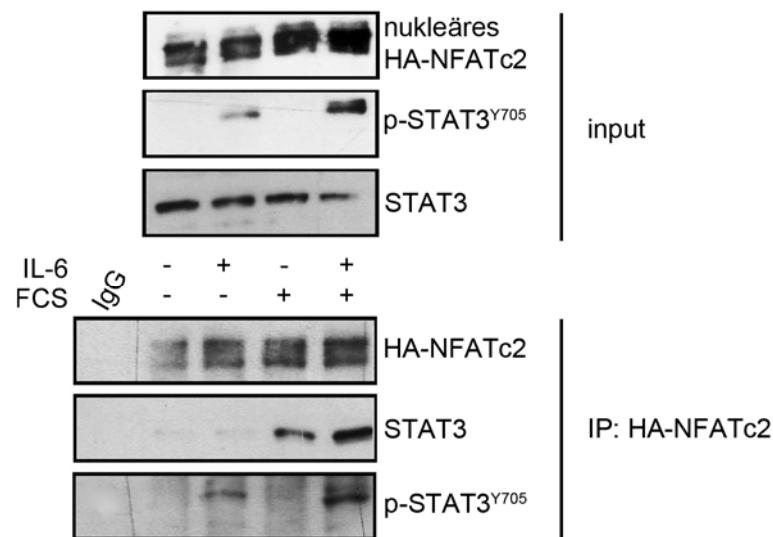


Abbildung 35: Analyse der NFATc2-STAT3-Interaktion. Stabile wt NFATc2 Suit007-Zellen wurden mit Flag-wt STAT3 transfiziert und 24 h mit serumfreiem bzw. serumhaltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie 30 min mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert. HA-NFATc2 wurde immunpräzipitiert und im Western Blot auf Interaktion mit STAT3 und p-STAT3^{Y705} getestet.

Außerdem konnte ein NFATc2/STAT3/GSK-3 β -Komplex im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 36).

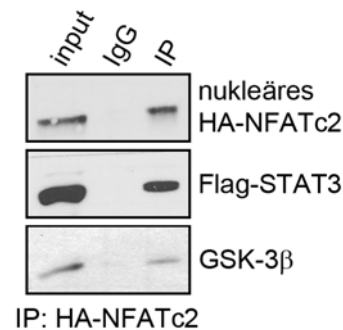


Abbildung 36: Analyse der NFATc2-Interaktionspartner im Zellkern. Kernlysate von PaTu8988t-Zellen mit stabiler wt NFATc2-Überexpression wurden mit Flag-wt STAT3 transfiziert und nach 24 h wurden die Kernlysate mit einem HA-Antikörper inkubiert und anschließend im Western Blot mit HA-, Flag- und GSK-3 β -Antikörpern gefärbt.

Der Einsatz von verschiedenen STAT3-Expressionskonstrukten (wt und Y705F) im DNA-Pulldownassay bewies ferner, dass sowohl der Wildtyp, als auch das Y705F-Konstrukt lokal an der NFAT-Konsensusstelle der DNA mit NFATc2 interagieren (Abb. 37).

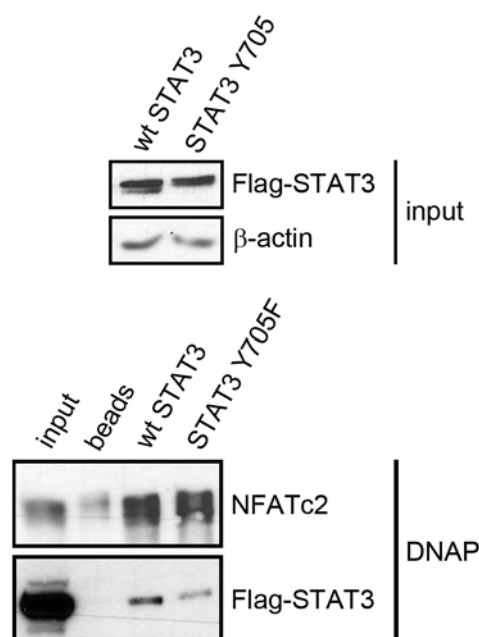


Abbildung 37: DNA-Pulldownassay zur Demonstration einer NFATc2-STAT3-Kooperation an der DNA. Nukleäre Lysate von PaTu8988t-Zellen nach Transfektion mit wt STAT3 und STAT3 Y705F wurden mit NFAT-Konsensus-Oligonukleotiden inkubiert. DNA-gebundenes NFATc2 wurde mit Streptavidin-Agarose-Beads präzipitiert und im Western Blot auf die Interaktion mit Flag-STAT3 an der DNA analysiert.

Zur Analyse der Bedeutung von GSK-3 β in diesem Komplex wurden PaTu8988t-Zellen mit stabiler wt NFATc2 und NFATc2 pSP2-Überexpression für 3 h mit AR-A behandelt. Aus den Kernlysaten wurde anschließend STAT3 immunpräzipitiert und im Western Blot auf eine Interaktion mit HA-NFATc2 getestet. Abb. 38 belegt zunächst, dass NFATc2 unabhängig von dessen SP2-Phosphorylierungszustand mit STAT3 interagiert. Weiterhin wird gezeigt, dass die Hemmung der GSK-3 β -Aktivität die Bindung von sowohl wt NFATc2 als auch NFATc2 pSP2 mit STAT3 unterbindet. Diese Daten deuten demzufolge darauf hin, dass die NFATc2-STAT3-Interaktion im Zellkern unabhängig von der SP2-Phosphorylierung durch GSK-3 β stabilisiert wird.

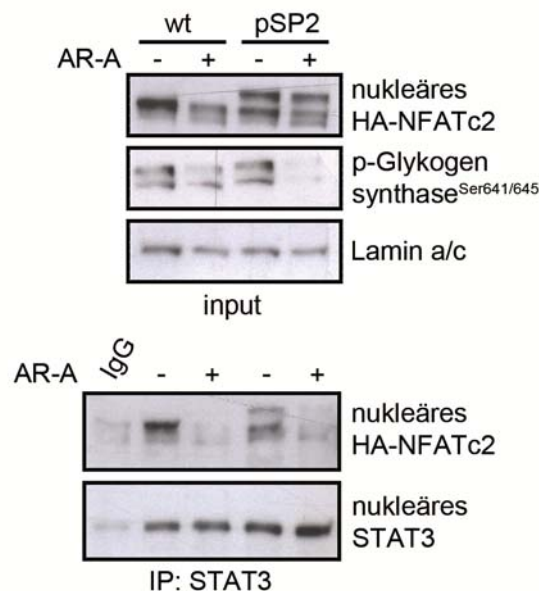


Abbildung 38: GSK-3 β -Abhängigkeit der STAT3-NFATc2-Interaktion im Zellkern. Stabile PaTu8988t-Zellen wurden mit 25 μ M AR-A behandelt und nach 3 h wurden Kernlysate hergestellt. Aus diesen wurde STAT3 immunpräzipitiert und im Western Blot wurde auf eine Interaktion mit HA-wt NFATc2 bzw. NFATc2 pSP2 untersucht. Zur Demonstration der erfolgreichen AR-A-Behandlung wurde in Western Blot-Analysen (oben) weiterhin mit HA-, p-Glykogensynthase und Lamin a/c-Antikörpern inkubiert.

Um die funktionelle Bedeutung der NFATc2-STAT3-Interaktion zu ermitteln, wurden Luciferase-Reporterassays durchgeführt. Diese enthüllten, dass die transkriptionelle Aktivität von NFATc2 durch die gleichzeitige STAT3-Überexpression deutlich gesteigert wird. Passend zu den IP-Daten erfolgte dies unabhängig des SP2-Phosphorylierungsstatus (Abb. 39A). Darüber hinaus konnte die STAT3-vermittelte Transaktivierung von NFATc2 durch pharmakologische GSK-3 β -Hemmung antagonisiert werden (Abb. 39B). Des Weiteren belegt der Reporterassay, dass die STAT3-vermittelte Transaktivierung nicht durch eine unspezifische Bindung von STAT3 an cisNFAT erfolgt, da in den „NFATc2-defizienten“ Kontrollzellen keine Induktion der transkriptionellen Aktivität nach STAT3-Überexpression festzustellen war.

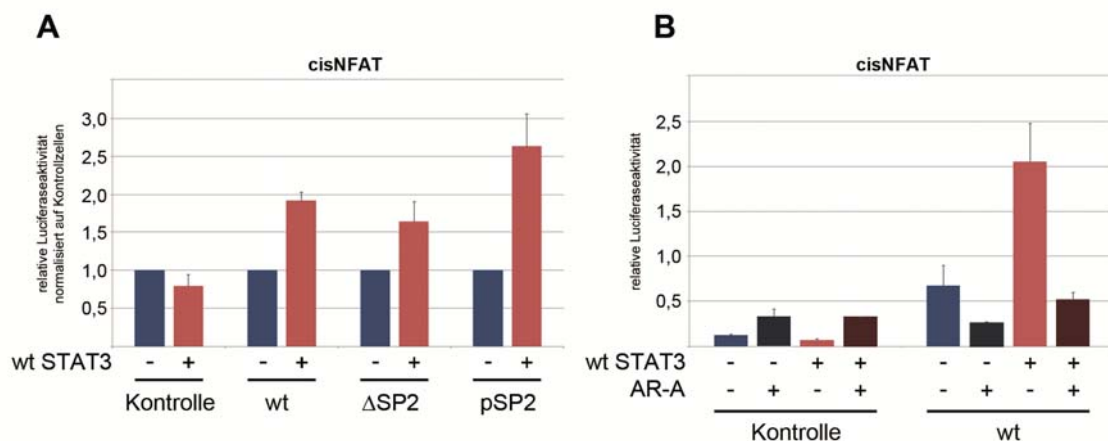


Abbildung 39: Analyse der funktionellen NFATc2-STAT3-Interaktion. **A.** Stabile PaTu8988t-Zellen wurden mit einem STAT3-Expressionskonstrukt sowie mit cisNFAT und Renilla-Luciferase transfiziert. 24 h danach wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD normalisiert auf die Kontrollen. **B.** Stabile Suit007-Zellen wurden mit wt STAT3, cisNFAT und Renilla-Luciferase transfiziert. 24 h danach wurden die Zellen 6 h mit 25 μ M AR-A behandelt und auf die Luciferaseaktivität überprüft. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Neben der physikalischen Interaktion ist auch die funktionelle Interaktion zwischen NFATc2 und STAT3 unabhängig von der Y705-Phosphorylierung. So konnte der nachfolgende Reporterassay eindeutig eine Induktion der NFATc2-Aktivität nach Überexpression des Y705F-Konstruktes in wt NFATc2-Zellen nachweisen, nicht jedoch in den Kontrollzellen ohne endogene NFATc2-Expression (Abb. 40).

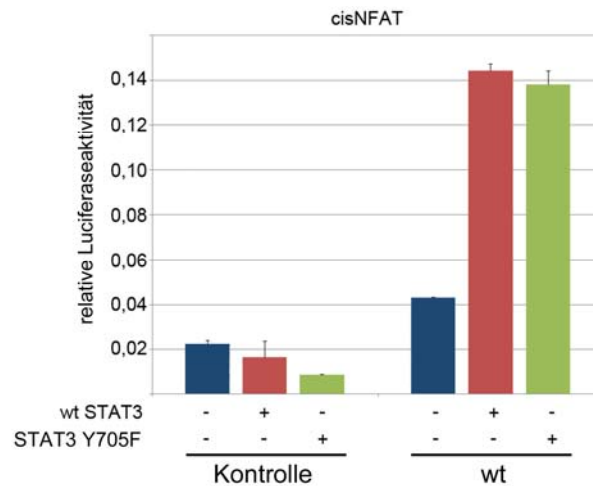


Abbildung 40: Luciferase-Reporterassay zur Darstellung der NFATc2-Aktivierung nach Überexpression verschiedener STAT3-Expressionskonstrukte. Stabile Suit028-Zellen wurden mit den Effektorplasmiden wt STAT3 bzw. STAT3 Y705F sowie mit den Reporterkonstrukten cisNFAT und Renilla-Luciferase transfiziert und nach 24 h einer Luciferase-Aktivitätsmessung unterzogen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Abschließend konnte der folgende Luciferase-Reporterassay eine starke Abhängigkeit von STAT3 in der funktionellen NFATc2-GSK-3 β -Kooperation bestätigen. So verursacht die genetische Depletion von STAT3 eine deutliche Reduktion der NFATc2-Transaktivierung an cisNFAT nach c.a. GSK-3 β -Überexpression (Abb. 41). Diese Daten liefern Hinweise auf eine pSP2 unabhängige, funktionelle GSK-3 β -NFATc2-STAT3-Kooperation, welche in einer Stabilisierung der NFATc2-Aktivität resultiert.

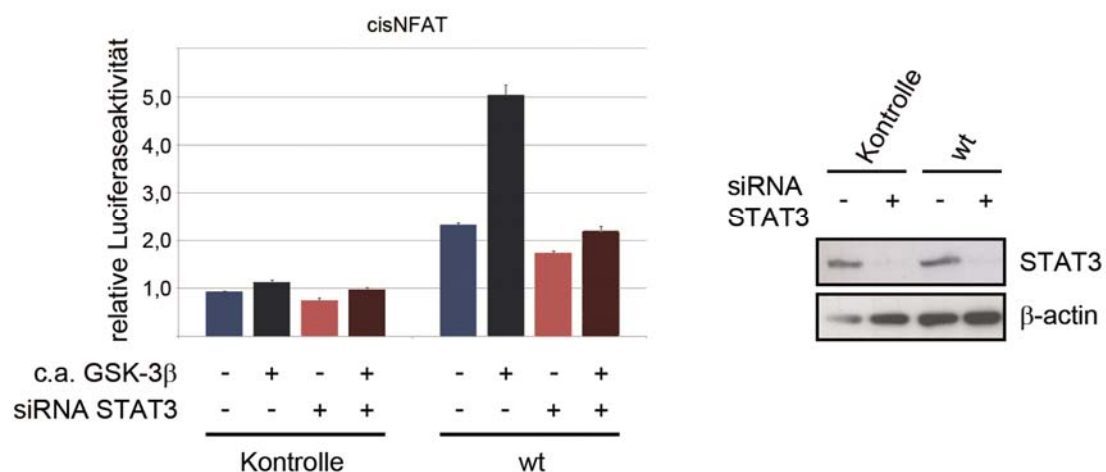


Abbildung 41: Analyse der STAT3-Abhängigkeit einer funktionellen NFATc2-GSK-3 β -Kooperation. Links: Stabile Suit007-Zellen wurden mit siRNA gegen STAT3 oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden diese weiterhin mit c.a.GSK-3 β , cisNFAT und Renilla-Luciferase transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde die Luciferaseaktivität ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte der Quotienten aus cisNFAT-Luciferase und Renilla-Luciferase \pm SD. Rechts: Western Blot zur Demonstration der erfolgreichen STAT3-Depletion. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.7 GSK-3 β induziert die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen durch die SP2-abhängige Stabilisierung von NFATc2 sowie durch eine übergeordnete, STAT3-abhängige Induktion der NFATc2-Aktivität

Der nachfolgende BrdU-Proliferationsassay enthüllte die Bedeutung von STAT3 für das NFAT-abhängige Wachstum von Pankreaskarzinomzellen. Die stabile Überexpression von NFATc2 in „NFATc2-defizienten“ Zellen induzierte die Tumorzellproliferation erheblich, dies wurde jedoch nach STAT3 *knockdown* deutlich antagonisiert (Abb. 42).

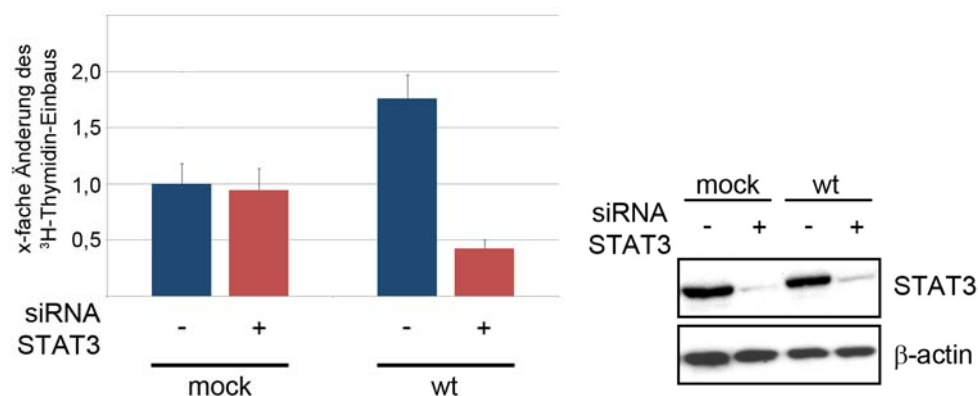


Abbildung 42: Proliferationsassay nach genetischem STAT3-*knockdown*. Stabile Suit007-Zellen wurden mit STAT3-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und nach 72 h wurde der ^3H -Thymidin-Einbau gemessen. Angezeigt sind die Mittelwerte \pm SE von drei unabhängigen Experimenten relativ zu der mock Kontrolle. Der erfolgreiche *knockdown* ist im Western Blot rechts dargestellt.

Die NFATc2-STAT3-Kooperation ist unabhängig von der SP2-Phosphorylierung, denn in Zellen mit stabiler NFATc2 pSP2-Überexpression wurde die NFATc2-abhängige Wachstumsinduktion nach STAT3 *knockdown* ebenfalls reprimiert (Abb. 43). Folglich ist STAT3 essentiell für NFATc2-induziertes Zellwachstum.

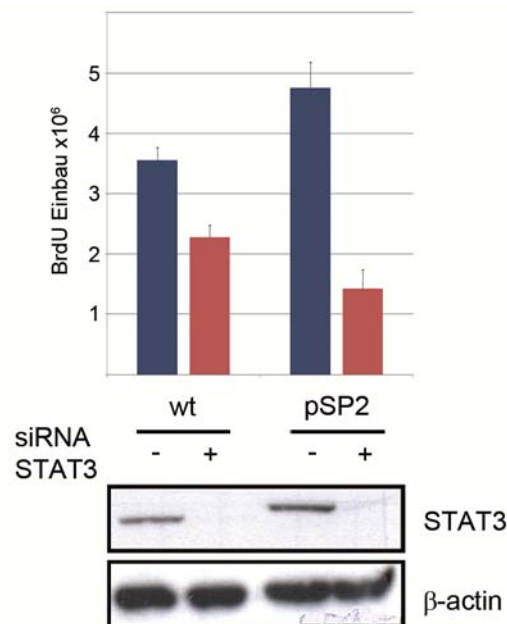


Abbildung 43: BrdU-Proliferationsassay nach genetischem STAT3-*knockdown*. Stabile PaTu8988t-Zellen wurden mit STAT3-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und nach 72 h wurde der BrdU-Einbau gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. Der Western Blot darunter demonstriert den erfolgreichen *knockdown*.

Zuletzt wurde ein BrdU-Assay durchgeführt, indem wt NFATc2 und pSP2-überexprimierende Zellen einerseits mit STAT3 siRNA transfiziert wurden (48 h) und andererseits zusätzlich mit AR-A behandelt (24 h) wurden. Der *knockdown* von STAT3 sollte Effekte ausschließen, die durch die Interaktion zwischen STAT3 und NFATc2, folglich durch die NFATc2-Aktivität vermittelt werden. Tatsächlich konnte die Überexpression des stabilen NFATc2 pSP2-Konstruktes eine Proliferationshemmung nach AR-A-Behandlung antagonisieren (Abb. 44). Aus den Daten kann letztendlich abgeleitet werden, dass der proliferationshemmende Effekt von AR-A in Abwesenheit von STAT3 nur noch durch die verminderte Proteinstabilität und nicht mehr durch die Aktivität

vermittelt wird. Daher kann die Proliferation von wt NFATc2-Zellen nach STAT3 *knockdown* weiter gehemmt werden, nicht jedoch von pSP2-Zellen.

Zusammenfassend weisen diese Daten stark darauf hin, dass GSK-3 β einerseits durch Phosphorylierung der SP2-Region einen stabilisierenden Effekt auf NFATc2-Proteine ausübt und andererseits die NFATc2-Aktivität – SP2-unabhängig und damit folglich unabhängig des Effektes auf die Proteinstabilität – erhöht und damit letztendlich das Wachstum im Pankreaskarzinom kontrolliert.

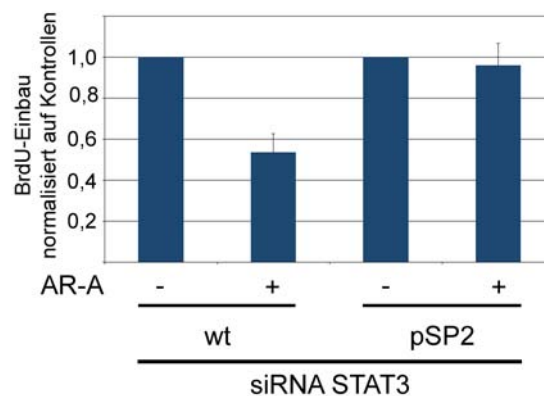


Abbildung 44: Proliferationsassay nach STAT3-*knockdown* und pharmakologischer GSK-3 β -Hemmung. Stabile Suit028-Zellen wurden mit STAT3-siRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit 25 μ M AR-A behandelt. Nach insgesamt 48h wurde der BrdU-Einbau ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD.

5 Diskussion

5.1 GSK-3 β fördert das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo*

GSK-3 β wurde ursprünglich als Tumorsuppressor beschrieben, welcher hauptsächlich durch die Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges das Wachstum von Kolonkarzinomzellen hemmt. Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert die Zellproliferation und Zelldifferenzierung, eine Fehlregulation ist dabei mit der Tumorentstehung verbunden. Bei Abwesenheit des Wnt-Signals liegt GSK-3 β , gemeinsam mit dem Strukturprotein Axin, APC, CK1, Proteinphosphatase 2A (PP2A) sowie mit „ β -transducin repeat containing protein“ (β -TrCP), als Zerstörungskomplex vor, welcher die Phosphorylierung von β -Catenin erleichtert und dieses somit für den Abbau im 26s-Proteasom markiert. Bei Anwesenheit von Wnt hingegen wird der Zerstörungskomplex aufgelöst, β -Catenin akkumuliert im Cytoplasma und transloziert daraufhin in den Zellkern. Dort reguliert es die Transkription von Zielgenen, die an der Zellproliferation (z.B. c-myc, c-jun, Cyclin D1), Zelladhäsion (z.B. E-Cadherin) sowie Tumorinvasion und Metastasierung (z.B. COX, VEGF, MMP-7) beteiligt sind (Übersicht in: Polakis, 2007). Darüber hinaus kann GSK-3 β die Proteolyse von Cyclin D1, c-myc und c-jun unabhängig von Wnt/ β -Catenin einleiten (Diehl *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2005). Demgegenüber deckten jüngste Daten eine wachstumsfördernde Rolle von GSK-3 β in mehreren Tumoren auf, die durch verschiedene Mechanismen charakterisiert ist. Die pro-proliferative Funktion von GSK-3 im Pankreaskarzinom konnte durch die vorliegenden Daten bestätigt werden. Nach pharmakologischer und genetischer Inaktivierung von GSK-3 konnte demnach eine deutliche Proliferationshemmung von verschiedenen Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Nur der genetische *knockdown* beider GSK-3-Isoformen führte zu einer signifikanten Proliferationshemmung. Im Einklang dazu konnten auch andere Arbeiten keine Proliferationshemmung nach isoliertem *knockdown* der β -Isoform beobachten, sondern nur nach *knockdown* der α -Isoform zu späten Zeitpunkten. Die Gabe von pharmakologischen Inhibitoren hingegen war weitaus effektiver (Wilson und Baldwin, 2008). Wang *et al.* (2010) beschreiben

weiterhin, dass die Transfektion von GSK-3 β -siRNA in MLL Leukämie-Stammzellen zwar nicht zur Proliferationshemmung führt, die Zellen jedoch deutlich gegen eine pharmakologische Behandlung mit AR-A014418 empfindlicher macht. Die Analyse der Isoformspezifität ist von Studie zu Studie unterschiedlich, dabei liegen deutlich mehr Untersuchungen über GSK-3 β vor. Weiterhin ist es aufgrund der großen Ähnlichkeit, z.B. hinsichtlich Substratspezifität, schwierig, eine Unterscheidung zu treffen. Viele GSK-3-Inhibitoren hemmen auch die strukturell ähnlichen CDKs. Dahingegen wurde der Inhibitor AR-A als hocheffektiver und spezifischer GSK-3-Inhibitor beschrieben, welcher die Aktivität von 26 anderen getesteten Kinasen (darunter CDK2 und CDK5) nicht beeinflusst. Dennoch unterscheidet er nicht zwischen α - und β -Isoform (Bhat *et al.*, 2003). Zudem ist es möglich, dass die Proliferationshemmung zusätzlich durch unspezifische „*off-target*“ Effekte des Inhibitors vermittelt wird. Jedoch konnte eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung durch AR-A beobachtet werden, was einen spezifischen Effekt befürwortet. Darüber hinaus kann eine korrelative Regulation der Proteinexpression, mRNA-Mengen sowie Promoteraktivität der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 und NFATc2 schon nach genetischer Inaktivierung, bzw. Überexpression der β -Isoform beobachtet werden. Es muss jedoch noch geklärt werden, inwiefern die α -Isoform in die Regulation des NFAT-Metabolismus eingebunden ist. Zusammenfassend ist die GSK-3 β -Isoform ausreichend, um NFATc2-vermitteltes Wachstum von Pankreas-karzinomzellen *in vitro* und *in vivo* zu induzieren und um die Expression von Cyclin D1 zu regulieren. Allerdings ist sie nicht essentiell, da der alleinige *knockdown* der β -Isoform nicht zur Proliferationshemmung führt. Wahrscheinlich ist der Effekt auf die Zellproliferation abhängig von der zellulären Situation zu einem bestimmten Zeitpunkt und benötigt eine Inaktivierung weiterer transformierender Ereignisse, z.B. von GSK-3 α .

Zurzeit liegen keine Daten darüber vor, welche Ereignisse darüber entscheiden, ob GSK-3 β als Tumorsuppressor oder Tumorprogressor wirkt, bzw. was eine verstärkte Expression und Aktivität von GSK-3 β in Tumorzellen induziert. Die Inaktivierung von β -Catenin erfolgt im Cytoplasma (Polakis, 2007). Abgesehen von ihrer vorherrschenden Lokalisation im Cytoplasma, kann GSK-3 β in

manchen Zellen jedoch in hohen Mengen im Zellkern und in den Mitochondrien nachgewiesen werden, wo sie im Vergleich zur cytoplasmatischen GSK-3 β hoch aktiv ist (Bijur und Jope, 2003; Meares und Jope, 2007). Darüber hinaus wurden eine starke Überexpression sowie abberante Akkumulation von aktiver GSK-3 β im Zellkern von Pankreaskarzinomzellen, humanen Pankreasadenokarzinomen, Nierenzellkarzinomen und Blasenkarzinomen identifiziert, die signifikant mit Entdifferenzierung und einem aggressivem Phänotyp korrelieren (Ougolkov *et al.*, 2006; Bilim *et al.*, 2009; Naito *et al.*, 2010). Die Kinaseaktivität ist dabei essentiell für die nukleäre Akkumulation, da die pharmakologische Hemmung von GSK-3 β mit einer proteosomalen Degradation im Zellkern von Pankreaskarzinomzellen einhergeht (Ougolkov *et al.*, 2006). Somit wäre es denkbar, dass die duale Funktion der GSK-3 β in der Tumorgenese durch ihre subzelluläre Lokalisation moduliert wird, wobei eine nukleäre Lokalisation mit einem pro-proliferativem Phänotyp einherginge. Es ist hierbei noch nicht geklärt, durch welchen Mechanismus der „shuttle“ zwischen Cytoplasma und Zellkern geregelt wird. In vorliegender Arbeit konnten tatsächlich hohe Mengen aktiver GSK-3 β im Zellkern von Tumorzelllinien sowie Tumorgeweben nachgewiesen werden. Letztendlich muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden, ob die subzelluläre Lokalisation mit einer differenziellen Zielgenexpression einhergeht (z.B. durch Chip-seq oder Microarrays).

5.2 GSK-3 β vermittelt die wachstumsfördernden Effekte durch eine onkogene Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor NFATc2

GSK-3 β erhält die Aktivierung von NF- κ B und damit das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen aufrecht. Die pharmakologische Hemmung von GSK-3 β hemmt die Expression von NF- κ B-Zielgenen (XIAP, Bcl-XL, Bcl-2, Cyclin D1), welche an der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen beteiligt sind (Hoefflich *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2004; Ougolkov *et al.*, 2005 und 2007; Wilson and Baldwin, 2008; Billadeau, 2007). Darüber hinaus führt die Inaktivierung von GSK-3 β zu einer Stabilisierung von aktivem p53, was im Gegenzug Apoptose und Wachstumsarrest in Kolonkarzinomzellen *in vitro* und

in vivo sowie in hepatozellulären Karzinomzellen, nicht jedoch in gesunden Hepatozyten einleitet (Gosh und Altieri, 2005; Beurel *et al.*, 2009). Der GSK-3 β *knockdown* ist andererseits mit reduzierten Mengen von p21, Jun N-terminaler Kinase (JNK) und p53, sowie mit einer reduzierten Cyclin D1-, CDK6- und Retinoblastomaprotein-Phosphorylierung und folglich mit dem Zellzyklusarrest in einigen Magen-, Pankreas- und Kolonkarzinomzellen assoziiert (Mai *et al.*, 2009). Schließlich werden die Aktivität und Expression der humanen Telomerase reversen Transkriptase (hTERT) sowie die Telomerlänge in humanen Tumorzellen nach GSK-3-Hemmung supprimiert (Bilsland *et al.*, 2009; Mai *et al.*, 2009). Unabhängig von den vorgeschlagenen Mechanismen konnte hier ein neuer GSK-3-abhängiger pro-proliferativer Mechanismus identifiziert und charakterisiert werden. Dieser impliziert, dass der onkogene Transkriptionsfaktor NFATc2 durch die GSK-3 β -vermittelte Phosphorylierung stabilisiert wird. Diese Beobachtungen werden durch Yoeli-Lerner *et al.* (2009) unterstützt, die einen proteosomalen Abbau sowie Aktivitätsverlust von NFATc2 nach pharmakologischer sowie molekularer (durch c.a. Akt) GSK-3 β -Hemmung beschreiben. Dies geht einher mit einer verminderten Migration von Brustkarzinomzellen, bisher wurde jedoch kein Mechanismus aufgezeigt. Die Daten dieser Arbeit demonstrieren, dass die Stabilisierung über drei konservierte Serine im SP2-Motiv des NFATc2-Proteins im Zellkern vermittelt wird. Dazu wurde ein p-NFATc2-Antikörper eingesetzt, welcher die Phosphorylierung der drei Serine in der SP2-Region erkennt. Somit konnte bestätigt werden, dass GSK-3 β tatsächlich die Phosphorylierung dieser drei Serine moduliert. Die Hypo-Phosphorylierung der SP2-Region destabilisiert das NFATc2-Protein, wie durch zielgerichtete Mutagenese bestätigt werden konnte. Weiterhin bewahrt die konstitutive Phosphorylierung der SP2-Region NFATc2 vor dem proteosomalen Abbau im Zellkern. Schließlich verstärkt die stabile Überexpression von NFATc2 pSP2 das NFAT-vermittelte Wachstum von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo*. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zur Literatur. Daraus geht hervor, dass die Phosphorylierung dieser Serine den nukleären Export von NFATc2 einleitet sowie dessen transkriptionelle Aktivität in Lymphozyten beendet. In humanen Pankreastumorzellen sowie -geweben hingegen ist die NFATc2 pSP2-Form in hohen Mengen im Zellkern nachweisbar. Zudem ist sie zur Interaktion mit der

DNA befähigt und weist eine deutliche höhere transkriptionelle Aktivität, verglichen mit dem Wildtyp, auf. Noch ist unklar, ob die verstärkte DNA-Bindung und Aktivität durch höhere Proteinmengen oder durch die Phosphorylierung *per se* bedingt ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die SP2-Phosphorylierung tatsächlich einen nukleären Export einleitet, und dadurch den Durchsatz erhöht, um so mehr aktives NFATc2 pro Zeiteinheit in den Zellkern zu befördern. Bei Hemmung der Exportkinase würde NFATc2 zwar im Zellkern akkumulieren, jedoch aufgrund der fehlenden Phosphorylierung rasch abgebaut werden. Daneben bleibt der Einfluss anderer NFAT-Kinasen auf die Proteinstabilität bzw. den Metabolismus im Tumor ungeklärt.

Es ist anzunehmen, dass die GSK-3 β -NFATc2-Kooperation ein tumor-spezifisches Merkmal darstellt, welches von anderen Zellen abgegrenzt ist. GSK-3 β ist in T-Zellen als Exportkinase von NFAT beschrieben, daher würde eine Hemmung der Kinaseaktivität hier z.B. mit einer gegenteiligen Reaktion, nämlich der nukleären Akkumulation von NFATc2 einhergehen (Beals *et al.*, 1997; Gwack *et al.*, 2000; Okamura *et al.*, 2000). Weiterhin wird NFATc2 in gesundem Pankreasgewebe nicht exprimiert, sondern erst in den fortgeschrittenen PanIN-2/3-Läsionen, wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte. Dennoch muss weiter geklärt werden, welchen Einfluss eine GSK-3 β -Hemmung auf den NFATc2-Metabolismus in anderen Körperzellen hätte. Die onkogene GSK-3 β -NFATc2-Kooperation (bzw. erhöhte Expressionslevel der NFATc2 pSP2-Form) könnte somit einen Marker der neoplastischen Transformation im Pankreaskarzinom darstellen. Zur näheren Charakterisierung als potentieller diagnostischer und prognostischer Marker bedarf es weiterer Analyse von z.B. einer differentiellen Genexpression oder der Verteilung von NFATc2 pSP2 im Pankreastumorgewebe.

5.3 GSK-3 β stabilisiert die Interaktion von NFATc2 mit dem onkogenen Transkriptionsfaktor STAT3

Die konstitutive SP2-Phosphorylierung kann die Proliferationshemmung nach AR-A-Behandlung nicht antagonisieren. Die Daten dieser Arbeit deuten ferner darauf hin, dass die GSK-3 β -Aktivität – unabhängig von ihren Effekten auf die

Proteinstabilität – mit der transkriptionellen Aktivität von NFATc2 korreliert. NFATc2 alleine weist eine schwache Affinität zur DNA auf und reguliert seine Zielpromotoren daher fast ausschließlich in Interaktion mit Partnerproteinen (Hogan *et al.*, 2003). Demnach wurde angenommen, dass GSK-3 β die Regulation der NFAT-Aktivität über die Interaktion mit Partnerproteinen vermittelt. Dabei konnte der Transkriptionsfaktor „*signal transducer and activator of transcription 3*“ (STAT3) als potentieller Partner identifiziert werden. Die STAT-Familie der Transkriptionsfaktoren besteht aus sieben Mitgliedern (STAT1-4, 5A, 5B und 6). Abb. 45 zeigt eine vereinfachte Übersicht über die kanonische STAT-Signaltransduktionskaskade. Diese wird durch die Bindung eines Liganden (z.B. Cytokine) an einen Transmembranrezeptor (z.B. EGFR) aktiviert. Die nachfolgende Rezeptordimerisierung aktiviert Rezeptor-gebundene Kinasen, zu den wichtigsten STAT-Kinasen zählen dabei die Janus-Kinasen (JAKs), welche die Phosphorylierung eines wichtigen C-terminalen Tyrosins (Y705 bei STAT3) vermitteln. Phosphorylierte STATs (P-STATs) bilden Homo- oder Heterodimere und translozieren in den Zellkern, wo sie die Expression ihrer Zielgene induzieren/reprimieren (Aaronson und Horvath, 2002; Levy und Darnell, 2002; Ehret *et al.*, 2001). Die meisten STATs erkennen spezifische DNA-Regionen mit der Sequenz 5'-TTC(N₂₋₄)GAA-3', dabei bestimmt die exakte Nukleotidsequenz die unterschiedliche Bindungsaffinität der STAT-Mitglieder (Ehret *et al.*, 2001).

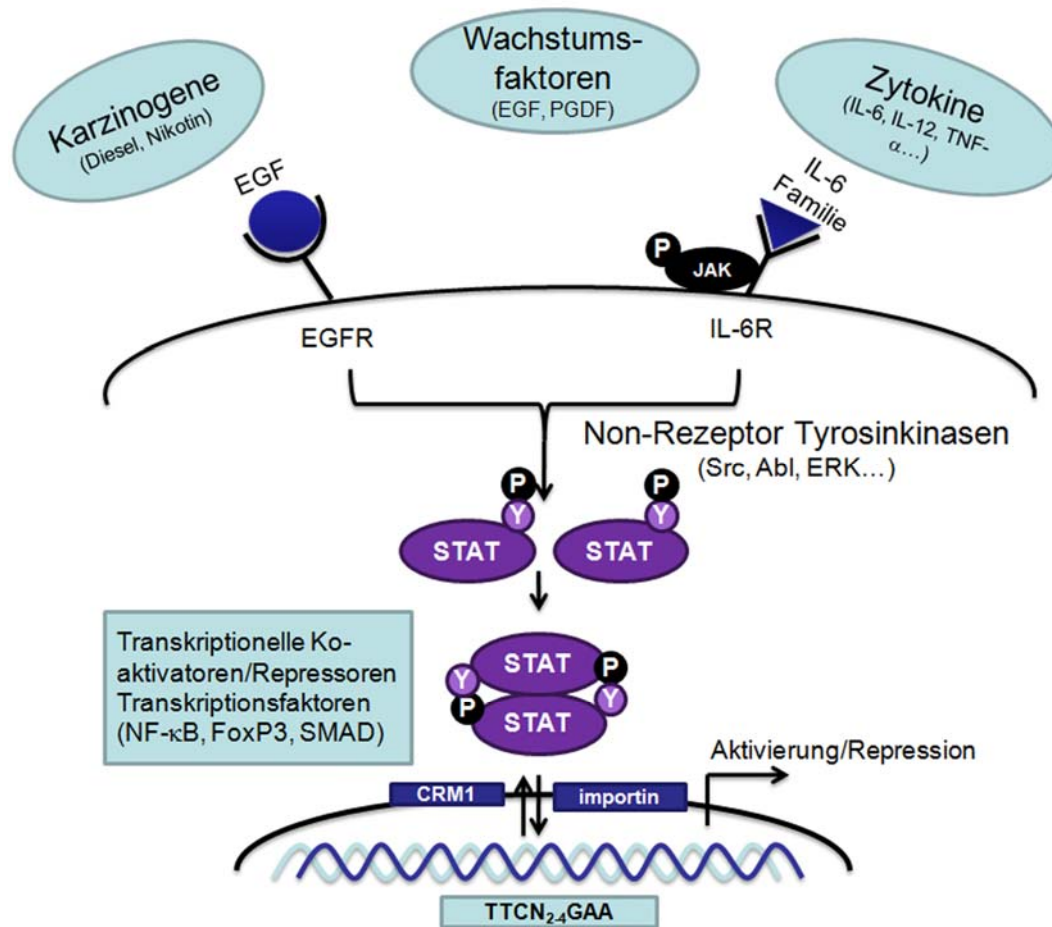


Abbildung 45: Vereinfachtes Modell der kanonischen STAT-Signaltransduktionskaskade.

Auf einen Stimulus hin werden die Transmembranrezeptoren epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) phosphoryliert und dimerisieren. Dabei phosphorylieren und aktivieren sie im Gegenzug Rezeptor-gebundene bzw. -ungebundene Tyrosinkinasen. Zu den wichtigsten Aktivatoren der STAT-Signalkaskade zählen die Januskinasen (JAKs). Rezeptor-ungebundene Kinasen sind z.B. Src, Abl und „*extracellular signal-regulated kinase*“ (ERK). Diese vermitteln die Tyrosinphosphorylierung von STAT-Proteinen, welche dimerisieren (als Homo- oder Heterodimere) und durch einen Importin-abhängigen Mechanismus in den Zellkern translozieren. Dort binden sie an ihre Zielpromotoren und vermitteln gemeinsam mit Ko-Aktivatoren/-Repressoren die Aktivierung/Repression der Transkription.

STAT3 wurde ursprünglich als ein Akute-Phase-responsiver Faktor in der Leber entdeckt, der durch Interleukin-6 (IL-6) aktiviert wird (Kishimoto, 2005). Er wird ubiquitär in den meisten Geweben exprimiert und durch Liganden wie IL-6, IL-10, EGF und „*platelet-derived growth factor*“ (PDGF) aktiviert. Das Fehlen des *STAT3*-Gens führt zur embryonalen Letalität (Takeda *et al.*, 1997). STAT3 wurde in vielen Tumoren in konstitutiv aktivem Zustand nachgewiesen, was wesentlich zur malignen Transformation beiträgt (Garcia *et al.*, 1997; Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 2000; Grandis *et al.*, 2000; Germain und Frank,

2007; Al Zaid Siddiquee und Turkson, 2008). Die Hemmung der STAT3-Aktivität vermittelt Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion *in vitro* sowie eine verringerte Tumorigenität *in vivo* (Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002). Mechanistisch wirkt STAT3 als zentraler Regulator von autonomen Tumorzelleigenschaften und vermittelt die Kommunikation zwischen Tumorzellen und Stroma- oder Immunzellen (Yu *et al.*, 2007). Eine direkte STAT-aktivierende Mutation konnte dabei bis heute nicht identifiziert werden (Burke *et al.*, 2001). Die Tyrosinkinase Src sowie der EGFR sind gut charakterisierte Aktivatoren der STAT3-Signalkaskade (Yu *et al.*, 1995; Grandis *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1996). Passend dazu wurde eine Überexpression und Aktivierung von Src und EGFR im Pankreaskarzinom dokumentiert (Lutz *et al.*, 1998; Korc, 1998). Schließlich konnten Scholz *et al.* (2003) nachweisen, dass STAT3 im Pankreaskarzinom überexprimiert und konstitutiv aktiv ist. Die funktionelle Inaktivierung von STAT3 geht dabei mit einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums durch eine Hemmung der G₁/S-Phase-Progression *in vitro* und *in vivo* einher (Scholz *et al.*, 2003). Seitdem akkumulieren die Hinweise auf eine essentielle Rolle von STAT3 in der Progression des Pankreaskarzinoms (Lin *et al.*, 2010; Huang und Sinicrope, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Die Aufrechterhaltung der NF- κ B-Aktivität in Tumoren ist abhängig von STAT3, ein vorgeschlagener Mechanismus ist z.B. die Hemmung des nukleären Exports durch p300-vermittelte Acetylierung von RelA (Lee *et al.*, 2009). Eine STAT3-vermittelte Regulation anderer Transkriptionsfaktoren ist außerdem nicht auszuschließen. Erste Hinweise auf eine NFAT-STAT-Kooperation im Tumor lieferten Lagunas und Clipstone (2009). Sie demonstrierten, dass die NFATc1-abhängige Transformation von murinen 3T3-L1-Fibroblasten sowie die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen abhängig von der STAT3-Aktivität sind. In Übereinstimmung dazu konnten unsere Beobachtungen einen neuen Transkriptionskomplex, bestehend aus NFATc2, STAT3 und GSK-3 β nachweisen. Hierbei interagieren diese im Zellkern von Pankreaskarzinomzellen sowie lokal an der NFAT-Konsensussequenz der DNA. Einen ersten Hinweis für das onkogene Potential dieser Kooperation liefert die Tatsache, dass die STAT3-NFATc2-Interaktion durch Serumstimulation induziert wird. Serum induziert wiederum das NFAT-vermittelte Wachstum von

Pankreaskarzinomzellen, teilweise durch eine pro-proliferative NFAT/c-myc-Kooperation (König *et al.*, 2010a). Es besteht demnach die Möglichkeit, dass Serum eine onkogene NFATc2-STAT3-Kooperation fördert, dies ist jedoch noch unzureichend untersucht. Proliferationsassays konnten zeigen, dass STAT3 für die NFAT-abhängige Wachstumsstimulation essentiell ist – auch unabhängig vom SP2-Phosphorylierungsstatus. Weiterhin kann die Aktivität von NFATc2 unabhängig vom SP2-Phosphorylierungsstatus nach Überexpression von STAT3 gesteigert werden. Die physikalische und funktionelle Interaktion ist abhängig von der GSK-3 β -Aktivität und unabhängig von der SP2-Phosphorylierung, da die Interaktion des Wildtyps sowie der pSP2-Form nach AR-A-Behandlung zerstört werden kann. Vor allem die Anwesenheit und Funktionalität aller Bestandteile des Transkriptionskomplexes ist essentiell zur Stabilisierung der NFAT-Aktivität, denn die beobachtete STAT3-bzw. GSK-3 β -abhängige Induktion der NFAT-Aktivität kann durch die Inaktivierung einer Komponente – durch AR-A bzw. STAT3 siRNA – antagonisiert werden. Zur weiteren Klärung der Bedeutung dieser Interaktion, bzw. der Einflusses von GSK-3 β muss der Ort der Interaktion identifiziert werden. Die Daten anderer Gruppen bestätigen, dass GSK-3 β Transkriptionskomplexe stabilisieren kann und infolgedessen das Tumorstadium fördert. Dabei erhält sie die Transkription von MLL Leukämie-Stammzellen durch die Rekrutierung der konditionellen Interaktion von „*cAMP response element-binding protein*“ (CREB) und seinen Co-Aktivatoren aufrecht, was im Gegenzug die „*homeobox*“ (HOX)-vermittelte Transkription und Transformation ermöglicht (Wang *et al.*, 2010). Weiterhin ist bekannt, dass GSK-3 β in manchen Zelltypen die Regulation von Dauer und Intensität der STAT3-Aktivierung vermittelt (Beurel und Jope, 2008; Beurel *et al.*, 2010). Die Eigenschaften von NFATc2 als Transkriptionsfaktor werden maßgeblich durch die Auswahl von Partnerproteinen bestimmt. Welche Bedeutung Partnerproteine für die onkogene Funktion von NFATc2 haben, ist bisher nur unzureichend erforscht. Es ist zu vermuten, dass die Auswahl der Partnerproteine zu einem bestimmten Zeitpunkt und abhängig vom Zelltyp darüber entscheidet, ob NFATc2 als Tumorsuppressor oder -progressor wirkt. Die Regulation eines Promotors ist zuletzt ein komplexer Vorgang, der durch die Beteiligung vieler Proteine (Transkriptionsfaktoren, Ko-Faktoren, „*chromatin remodeling*“ Proteine) charakterisiert ist. Somit gibt es sicherlich noch andere

Proteine, die an der Bildung dieser Transkriptionsmaschinerie beteiligt sind. Demzufolge ist die Identifizierung und Charakterisierung zentraler Transkriptionskomplexe, welche die onkogenen Eigenschaften von NFATc2 in der Pankreaskarzinogenese bedingen, sowie deren Regulation, essentiell. Dadurch können neue Therapieansätze in der Behandlung des Pankreaskarzinoms entstehen.

Die Interaktion und Stabilisierung der transkriptionellen Aktivität hängen nicht von den Eigenschaften von STAT3 als Transkriptionsfaktor ab. So belegt diese Arbeit, dass die physikalische und funktionelle Interaktion an der DNA unabhängig von der Y705-Phosphorylierung erfolgt. In diesem Zusammenhang konnten einige Arbeiten eine bedeutende Rolle von unphosphorylierten STATs (U-STATs) in der Tumorgenese belegen. Der STAT3-Promoter besitzt ebenfalls STAT3-Bindungsstellen und wird stark durch die Bindung von P-STAT-Dimeren aktiviert (z.B. nach IL-6-Stimulation), dabei wird die Expression der U-STATs eingeleitet. U-STAT3 pendelt konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern und induziert die Transkription von Zielgenen, welche sich von denen der kanonischen STAT3-Aktivierung unterscheiden. Dabei werden unter anderem Transkriptionskomplexe mit Partnerproteinen (z.B. NF- κ B) gebildet, was die Affinität zu Zielpromotoren spezifiziert und mit der Tumorgenese assoziiert ist (Yang *et al.*, 2005 und 2007; Yang und Stark, 2008). Es bleibt zu klären, ob eine spezielle Reihe von Zielgenen durch die NFATc2-STAT3-Kooperation reguliert wird. Dabei könnten potentielle Zielgene im Pankreaskarzinom mittels Chip-Seq und/oder Genexpressionsprofilanalysen identifiziert und weiter charakterisiert werden.

Die funktionelle Relevanz eines SP2-abhängigen Effektes auf die NFATc2-Proteinstabilität einerseits und eines GSK-3 β - und STAT3-abhängigen, SP2-unabhängigen Effektes auf die transkriptionelle Aktivität andererseits demonstriert der in dieser Arbeit letzte durchgeführte Proliferationsassay. Nach STAT3 *knockdown* ist der GSK-3 β -vermittelte Einfluss auf die Zellproliferation nicht mehr abhängig von der transkriptionellen Aktivität, sondern ausschließlich von der Proteinstabilität. Daher können die Zellen mit stabiler wt NFATc2-Expression nach AR-A Behandlung und zusätzlichem STAT3 *knockdown* weiter in ihrer Proliferation gehemmt werden. Zellen mit stabiler NFATc2 pSP2

hingegen sind resistent gegenüber einer weiteren Proliferationsreduktion nach STAT3 *knockdown*. Abb. 46 illustriert schließlich das vorgeschlagene Modell der GSK-3 β -vermittelten Regulation des NFAT-Metabolismus im Pankreaskarzinom. Hierbei vermittelt GSK-3 β die Phosphorylierung der SP2-Region im Zellkern und erhält somit die Proteinstabilität von NFATc2 sowie dessen hohen Durchsatz aufrecht. Andererseits vermittelt GSK-3 β Effekte auf die Aktivität, die unabhängig von der Proteinstabilität und der SP2-Phosphorylierung sind. Dabei wird die Interaktion mit STAT3 an der DNA gestärkt und damit die transkriptionelle Aktivität aufrechterhalten.

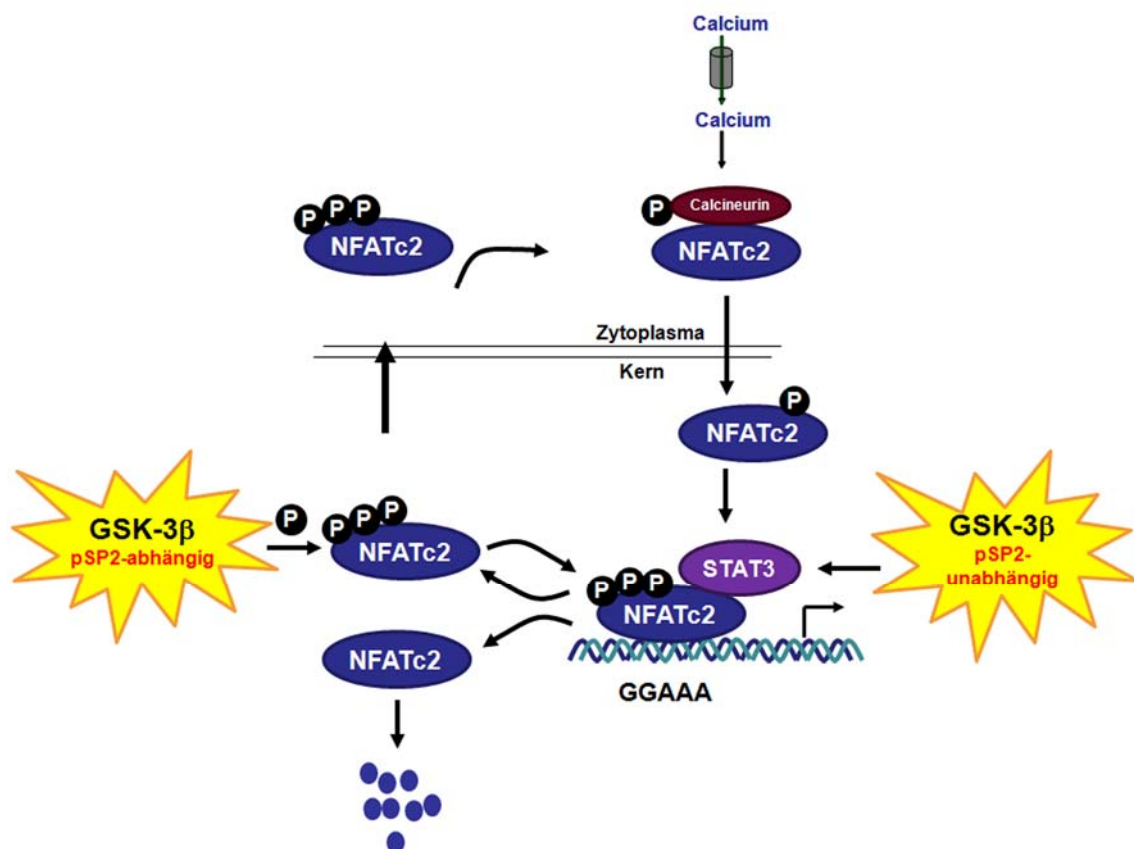


Abbildung 46: Aktuelles Modell der GSK-3 β -vermittelten Regulation des NFAT-Metabolismus. Nach einem intrazellulären Calciuminflux wird die Phosphatase Calcineurin aktiviert und dephosphoryliert NFATc2. Dieser transloziert in den Zellkern und bindet an seine Zielpromotoren mit der Konsensussequenz GGAAA. GSK-3 β leitet einerseits die Phosphorylierung der SP2-Region von NFATc2 im Zellkern ein und verstärkt so den nukleären Export und Durchsatz. Vor allem ist NFATc2 weiterhin transkriptionell aktiv und wird vor einer Degradation bewahrt. Andererseits stabilisiert GSK-3 β unabhängig von der SP2-Phosphorylierung die NFATc2-STAT3-Interaktion an der DNA und somit die transkriptionelle Aktivität.

5.4 Chancen und Risiken des Einsatzes von GSK-3 β als Zielmolekül in der Tumorthherapie des Pankreas

Aufgrund der bedeutenden Rolle in der Progression des Pankreaskarzinoms rückt die Entwicklung von tumorspezifischen NFAT-Inhibitoren immer stärker ins Rampenlicht. CsA und FK506 sind effektive Inhibitoren der Calcineurin-vermittelten NFATc2-Aktivierung. Aufgrund ihrer starken Hemmung der T-Zell-Antwort werden sie regelmäßig zur Immunsuppression nach Organtransplantationen eingesetzt. Sie weisen jedoch schwere Nebenwirkungen, wie Neuro- und Nephrotoxizität, gastrointestinale Störungen und Bluthochdruck auf. Darüber hinaus geht die Langzeiteinnahme (10 Jahre und länger) nach einer Organtransplantation mit der Entwicklung von Tumoren aufgrund der Unterdrückung der Immunsurveillance einher. Folglich ist die Entwicklung von tumorspezifischen NFAT-Inhibitoren von großer Bedeutung (Medyouf und Ghysdael, 2008).

Besonders wegen der vielschichtigen regulatorischen Eingriffe in den NFAT-Metabolismus erscheint der Einsatz von GSK-3 β -Inhibitoren zur tumorspezifischen NFAT-Hemmung von größerer Relevanz. Jedoch bestehen ernste Bedenken gegen GSK-3 β als Zielmolekül in der Tumorthherapie. GSK-3 β ist ein wichtiger Mediator des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, welcher in vielen Tumoren dereguliert ist. Es wurde angenommen, dass die Hemmung von GSK-3 β in einer Nachahmung der Wnt-Aktion resultiert, wodurch das Proto-Onkogen β -Catenin aktiviert würde. Demgegenüber konnte in GSK-3 $\beta^{-/-}$ Embryonen keine Beeinflussung des Wnt-Signalweges, der Cyclin D1-Regulation, der β -Catenin-Akkumulation oder des Glykogenmetabolismus nachgewiesen werden (Hoefflich *et al.*, 2000). Weiterhin ist der Verlust von GSK-3 β nicht ausreichend für eine Anhäufung von β -Catenin im Zellkern oder zur Aktivierung des „*leukemia enhancer factors-1*“ (LEF-1) in NIH-3T3-Zellen (Yuan *et al.*, 1999). In Übereinstimmung mit der Literatur konnte in dieser Arbeit keine Anhäufung von β -Catenin im Zellkern nach Behandlung mit AR-A *in vivo* beobachtet werden. Vielmehr wurden – entgegen der Erwartungen – verminderte Expressionsmengen von Cyclin D1 in Pankreaskarzinomzellen beobachtet. Des Weiteren finden im Kolonkarzinom keine inaktivierenden Mutationen von GSK-3-Genen statt, obwohl mehrere Bestandteile des β -Catenin-Zerstörungskomplexes (APC,

Axin, β -Catenin) nachweislich mutiert sind (Ougolkov and Billadeau, 2006). Trotz einer Deregulation von β -Catenin im Kolonkarzinom ist GSK-3 β hoch aktiv und wird für das Wachstum der Zellen benötigt (Ougolkov *et al.*, 2006). Passend dazu wurde eine Überexpression von aktiver GSK-3 β in menschlichen Kolonkarzinomzellen, gemeinsam mit erhöhten Akt-Spiegeln und nukleärer β -Catenin-Anhäufung beschrieben (Shakoori *et al.*, 2005). In einer Studie von Doble *et al.* (2007) wurde zur Untersuchung der isoformspezifischen Funktionen von GSK-3 embryonische Stammzellen der Maus (ESC) mit 0-4 funktionellen GSK-3 Allelen hergestellt. Zellen, welche nur eine Isoform exprimieren, zeigten keine Abnormalitäten im Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Die Inaktivierung von drei oder vier Allelen war essentiell, um einen Gendosis-abhängigen Effekt auf die β -Catenin-vermittelte Transkription zu vermitteln. Dabei konnte ein hyperaktiviertes Wnt/ β -Catenin-Signal erst dann beobachtet werden, wenn beide Isoformen in den ESC ausgeschaltet wurden. Das Fehlen der GSK-3 β -Isoform ist demnach nicht ausreichend, um die β -Catenin-Funktion zu beeinflussen. Vermutlich werden dazu zusätzliche transformierende Ereignisse benötigt (Doble *et al.*, 2007). Die Wnt/ β -Catenin-Aktivierung wird außerdem eher selten in Pankreaskarzinom gefunden (Gerdes *et al.*, 1999). Im Wesentlichen geht eine reduzierte β -Catenin-Expression eher mit einem aggressiven Phänotyp sowie mit einer schlechten Prognose im fortgeschrittenen Adenokarzinom des Pankreas einher (Watanabe *et al.*, 2003). Aus *in vivo* Studien geht hervor, dass eine Verabreichung von GSK-3-Inhibitoren weder zur verstärkten Bildung von Tumoren führt, noch schädliche Effekte auf die Tiere hat (Martinez, 2008; Shakoori *et al.*, 2007). Lithium – ein GSK-3-Inhibitor – wird weitverbreitet zur Langzeitbehandlung von Patienten mit bipolaren Störungen eingesetzt. Interessanterweise ist die Langzeitbehandlung keinesfalls mit einer erhöhten Inzidenz der Morbidität und Mortalität nach Tumorerkrankungen, sondern vielmehr mit einer verminderten Sterberate assoziiert (Cohen *et al.*, 1998). Multiple intestinale Polypen, die durch eine Mutation im APC-Gen entstehen, weisen keine erhöhte Anzahl an Polypen nach Lithiumbehandlung auf (Doble und Woodgett, 2003). Diese Daten weisen auf eine β -Catenin-unabhängige Funktion von GSK-3 β in der Karzinogenese des Pankreas hin und unterstützen den Einsatz von spezifischen Inhibitoren in der Tumorthherapie. In dieser Arbeit wurde zwar nicht erforscht, ob GSK-3 β

einen Einfluss auf das Wachstum von nicht-neoplastischen Zellen hat, jedoch konnten andere Autoren keinen Einfluss einer GSK-3-Hemmung auf das Wachstum von nicht-neoplastischen Zellen feststellen (s. Kapitel 1.2.3). Trotz vielversprechender Erkenntnisse ist die Funktion von GSK-3 β aufgrund der Regulation zahlreicher Substrate vor allem im Tumor noch unzureichend verstanden und bedarf weiterer Untersuchung.

5.5 Schlussfolgerung

Die Daten in dieser Arbeit konnten zeigen, dass GSK-3 β ein vielschichtiger Modulator des onkogenen Transkriptionsfaktors NFATc2 im Pankreaskarzinom ist. So vermittelt sie einerseits die Phosphorylierung von drei Serinen in der SP2-Region, was vor einem raschen Abbau im Zellkern schützt und das wachstumsfördernde Potential verstärkt. Die Identifizierung von STAT3 als NFATc2-Partnerprotein sowie die Regulierbarkeit der Interaktion durch GSK-3 β liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass die Phosphorylierung der SP2-Region das onkogene Potential von NFATc2 zwar steigert, umgekehrt jedoch nicht vor einer Proliferationshemmung nach GSK-3 β -Inaktivierung bewahrt. Die GSK-3 β -Aktivität ist demzufolge – unabhängig des Einflusses auf die Proteinstabilität – zusätzlich für die Stabilisierung der transkriptionellen Aktivität notwendig. Dies stellt folglich einen übergeordneten Regulationsmechanismus dar, da bei Inaktivierung von GSK-3 β auch die pSP2-Form nicht mehr mit STAT3 interagieren kann. Infolgedessen ist NFATc2 transkriptionell inaktiv und verliert – trotz der hohen Proteinstabilität – sein onkogenes Potential. Die hier dargestellte GSK-3 β -NFATc2-STAT3-Kooperation könnte somit eine neu identifizierte Signalkaskade im Pankreaskarzinom darstellen, über die das Tumorstadium reguliert wird. Die spezifische Unterbrechung dieser Interaktion, z.B. mittels GSK-3 β -Inhibitoren, könnte – vor allem in Kombination mit Gemcitabine – einen interessanten und neuen Ansatz in der Tumorthherapie des Pankreaskarzinoms liefern.

6 Literaturverzeichnis

Aaronson DS, Horvath CM (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296: 1653-1655

Al Zaid Siddiquee K, Turkson J (2008) STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res* 18: 254-267

Aramburu J, Yaffe MB, López-Rodríguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporine A. *Science* 285: 2129-2133

Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441: 595-600

Ballou LM, Tian PY, Lin HY, Jiang YP, Lin RZ (2001) Dual regulation of glycogen synthase kinase-3 β by the α 1A-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 276: 40910-40916

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275: 1930-1934

Beurel E, Blivet-Van Eggelpoël MJ, Kornprobst MJ, Moritz S, Deleo R, Paye F, Housset C, Desbois-Mouthon C (2009) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors augment TRAIL-induced apoptotic death in human hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 77: 54-65

Beurel E, Jope RS (2008) Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 283: 21934-21944

Beurel E, Michalek SM, Jope RS (2010) Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 31: 24-31

Bhat R, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormö M, Nilsson Y, Radesäter AC, Jerning E, Markgren PO, Borgegård T, Nylöf M, Giménez-Cassina A, Hernández F,

Lucas JJ, Díaz-Nido J, Avila J (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem* 278:45937-45945

Bijur GN, Jope RS (2001) Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem* 276: 37426-37442

Bijur GN, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3b is highly activated in nuclei and mitochondria. *NeuroReport* 14: 2415-2419

Bilim V, Ougolkov A, Yuuki K, Naito S, Kawazoe H, Muto A, Oya M, Billadeau D, Motoyama T, Tomita Y (2009) Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 101: 2005-2014

Billadeau DD (2007) Primers on molecular pathway. The glycogen synthase kinase-3 β . *Pancreatology* 7: 398-402

Bilsland AE, Hoare S, Stevenson K, Plumb J, Gomez-Roman N, Cairney C, Burns S, Lafferty-Whyte K, Roffey J, Hammonds T, Nicol Keith W (2009) Dynamic telomerase gene suppression via network effects of GSK-3 inhibition. *PLOS one* 4: e6459

Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19:2474-2488

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem* 72: 248-254

Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295-303

Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V (2006) Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* 25: 3714-3724

Buettner R, Mora LB, Jove R (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 8:945-954

Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J (2001) Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* 20: 7925-7934

Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*: 2403–2413.

Cao Q, Lu X, Feng YJ (2006) Glycogen synthase kinase-3 β positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res* 16: 671-677

Cao X, Tay A, Guy GR, Tan YH (1996) Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol* 16: 1595-1603

Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernández-Luna JL, Nuñez G, Dalton WS, Jove R (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10: 105-115

Chang CP, Neilson JR, Bayle JH, Gestwicki JE, Kuo A, Stankunas K, Graef IA, Crabtree GR (2004) A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* 118 (5):649-63

Chen M, O'Connor KL (2005) Integrin $\alpha 6 \beta 4$ promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene* 24: 5125-5130

Choo MK, Yeo H, Zayzafoon M (2009) NFATc1 mediates HDAC-dependent transcriptional repression of osteocalcin expression during osteoblast differentiation. *Bone* 45: 579-589

Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, Glöckner J, Fischer C, Kerstan A, Escher C, Inashkina I, Hlubek F, Jankevics E, Brabletz T, Serfling E (1999)

Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 162: 7294-7301

Cohen SJ, Pinover WH, Watson JC, Meropol NJ (2000) Pancreatic cancer. *Curr Treat Options Oncol* 1: 375-386

Cohen Y, Chetrit A, Cohen Y, Sirota P, Modan B (1998) Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Med Oncol* 15: 32-36

Crabtree GR, Schreiber SL (2009): Snapshot: Ca^{2+} -Calcineurin-NFAT Signaling. *Cell* 138: 210

Darnell JE jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3b regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12: 3499-3511

Doble BW, Patel S, Wood GA, Kockeritz LK, Woodgett JR (2007) Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell* 12: 957-971

Doble BW, Woodgett JR (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multitasking kinase. *J Cell Sci* 116: 1175-1186

Duque J, Fresno M, Iñiguez MA (2005) Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 280:8686-93

Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M, Bucher P (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem* 276:6675-6688

Eldar-Finkelman H (2002). Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8: 126–132.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107: 519–527.

Engelmann JA (2009) Targeting PI3K signaling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Rev Cancer* 9: 550-562

Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC Jr, Woodgett JR, Mills GB (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11960-11965.

Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359: 1-16

Frame S, Cohen P, Biondi RM (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* 7: 1321–1327.

Friday BB, Horsley V, Pavlath GK (2000) Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol* 149 :657-666

Garcea G, Manson MM, Neal CP, Pattenden CJ, Sutton CD, Dennison AR, Berry DP (2007) Glycogen synthase kinase-3 beta; a new target in pancreatic cancer? *Curr Cancer Drug Targets* 7: 209-215

Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL, Smithgall T, Fujita DJ, Ethier SP, Jove R (1997) Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 8: 1267-1276

Gerdes B, Ramaswamy A, Simon B, Pietsch T, Bastian D, Kersting M, Moll R, Bartsch D (1999) Analysis of b-catenin gene mutations in pancreatic tumors. *Digestion* 60: 544-548

Germain D, Frank DA (2007) Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 13: 5665-5669

Gladden AB, Diehl JA (2005) Location, location, location: The role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem* 96: 906-913

Gosh JC, Altieri DC (2005) Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3 β in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 11: 4580-4588

GR, Olson EN (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109: SupplS67-S79

Graef IA, Chen F, Crabtree GR (2001) NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 11: 505-512

Graef IA, Wang F, Charron F, Chen L, Neilson J, Tessier-Lavigne M, Crabtree GR (2003) Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* 113: 657-670

Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ (1998) Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth *In vitro*. *J Clin Invest* 102:1385-1392

Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y, Kim JD (2000) Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4227-4232

Gress TM, Müller-Pillasch F, Geng M, Zimmerhackl F, Zehetner G, Friess H, Büchler M, Adler G, Lehrach H (1996) A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene* 13: 1819-1830

Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65:391-426

Groner B, Lucks P, Borghouts C (2008) The function of Stat3 in tumor cells and their microenvironment. *Semin Cell Dev Biol* 19: 341-350

Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A (2006) A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441: 646-650

Hartigan JA, Johnson GV (1999) Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a

glycogen synthase kinase 3 β -dependent pathway. *J Biol Chem* 274: 21395-21401

Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 406: 86-90

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-2232

Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Kestler HA, Schwoerer A, Rau B, Radlwimmer B, Döhner H, Lichter P, Gress T, Bentz M (2004) Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes. *Cancer Res* 64:4428-4433

Horsley V, Pavlath GK (2002) NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol* 156:771-774

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J and Offerhaus GJ (2001) Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*. 25: 579-86

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman Huang S, Sinicrope FA (2010) Sorafenib inhibits STAT3 activation to enhance TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9:742-750

Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., and Kikuchi, A. (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK3 and β -catenin and promotes GSK-3-dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J*. 17, 1371–1384

Imamura R, Masuda ES, Naito Y, Imai S, Fujino T, Takano T, Arai K, Arai N (1998) Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly

created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J Immunol* 161: 3455-3463

Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A (2002) The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 4: 540-544

Joep RS, Johnson GV (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29: 95–102.

Kang T, Wei Y, Honaker Y, Yamaguchi H, Appella E, Hung MC, Piwnica-Worms H (2008) GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* 13: 36-47

Kishimoto T (2005) Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 23: 1-21

König A, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010b) Primers on Molecular Pathways - The NFAT Transcription Pathway in Pancreatic Cancer. *Pancreatology* 10: 416-422

König A, Linhart T, Schlengemann K, Reutlinger K, Wegele J, Adler G, Singh G, Hofmann L, Kunsch S, Büch T, Schäfer E, Gress TM, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010a) NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 138: 1189-1199

Korc M (1998) Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin North Am* 7: 25-41

Kotliarova S, Pastorino S, Kovell LC, Kotliarov Y, Song H, Zhang W, Bailey R, Maric D, Zenklusen JC, Lee J, Fine HA (2008) Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res* 68: 6643-6651

Kulikov R, Boehme KA, Blattner C (2005) Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol Cell Biol* 25: 7170-7180

Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA, Chen H (2007) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β , a downstream target of the raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther* 6: 1151-1158

Lagunas A, Clipstone NA (2009) Deregulated NFATc1 activity transforms murine fibroblasts via an autocrine growth factor-mediated Stat3-dependent pathway. *J Cell Biochem* 108: 237-248

Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H (2009) Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF- κ B activity in tumors. *Cancer Cell* 15: 283-293

Levy DE, Darnell JE Jr (2002) Stats: transcriptional control and biological impact *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 651-662

Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β . *Mol Cell Biol* 20: 9356-9363

Liao X, Zhang L, Thrasher JB, Du J, Li B (2003) Glycogen synthase kinase-3 β suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2: 1215-1222

Lin L, Hutzen B, Zuo M, Ball S, Deangelis S, Foust E, Pandit B, Ihnat MA, Shenoy SS, Kulp S, Li PK, Li C, Fuchs J, Lin J (2010) Novel STAT3 phosphorylation inhibitors exhibit potent growth-suppressive activity in pancreatic and breast cancer cells. *Cancer Res* 70:2445-2454

Lionetto R, Pugliese V, Bruzzi P, Rosso R (1995) No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 31A: 882-887

Lopez-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A (1999) NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA*: 96: 7214-7219

Luo J (2009). Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 273: 194-200

Lutz MP, Esser IB, Flossmann-Kast BB, Vogelmann R, Lühns H, Friess H, Büchler MW, Adler G (1998) Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 503-508

Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T cell development and function. *Nature Rev. Immunol* 5: 472-484

Mai W, Kawakami K, Shakoori A, Kyo S, Miyashita K, Yokoi K, Jin M, Shimasaki T, Motoo Y, Minamoto T (2009) Deregulated GSK3 β sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clin Cancer Res* 15: 6810-6819

Mai W, Miyashita K, Shakoori A, Zhang B, Yu ZW, Takahashi Y, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T (2006) Detection of active fraction of glycogen synthase kinase 3 β in cancer cells by nonradioisotopic in vitro kinase assay. *Oncology* 71: 297-305

Mamaghani S, Patel S, Hedley DW (2009) Glycogen synthase kinase-3 inhibition disrupts nuclear factor- κ B activity in pancreatic cancer, but fails to sensitize to gemcitabine chemotherapy. *BMC Cancer* 9: 132

Mancini M, Toker A (2010) NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 9: 810-820

Mancini M, Toker A (2009) NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 9: 810-820

Martinez A (2008) Preclinical efficacy on GSK-3 inhibitors: towards a future generation of powerful drugs. *Med Res Rev.* 28: 773-796

Mazor M, Kawano Y, Zhu H, Waxman J, Kypta RM (2004) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene* 23: 7882-7892

Meares GP, Jope RS (2007): Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 282:16989-17001

Medyouf H, Ghysdael J (2008) The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle* 7:297-303

Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM (1999) Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2538-2542

Miyashita K, Kawakami K, Nakada M, Mai W, Shakoori A, Fujisawa H, Hayashi Y, Hamada J, Minamoto T (2009) Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3 β inhibition against human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 15: 887-897

Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase/glycogen synthase kinase 3 β . *J Neurochem* 81: 1073-1083

Müller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bartek J, Eilers M, Strauss M (1994) Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2945-2949

Müller MR, Rao A (2010) NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10: 645-656

Naito S, Bilim V, Kaori Y, Ugolkov A, Motoyama T, Nagaoka A, Kato T, Tomita Y (2010) Glycogen synthase kinase-3 β : a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clin Cancer Res Epub ahead of print*

Neal JW, Clipstone NA (2001) Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *J Biol Chem* 276: 3666-3673

Neal JW, Clipstone NA (2003) A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem* 278: 17246-17254

Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC (2000) Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 60: 1225-1228

Okamura H, Aramburu J, García-Rodríguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahliliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6: 539-550

Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A (2004) A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* 24: 4184-4195

Ougolkov AV, Billadeau DD (2006) Targeting GSK-3: a promising approach for cancer therapy? *Future Oncol* 2: 91-100

Ougolkov AV, Bone ND, Fernandez-Zapico ME, Kay NE, Billadeau DD (2007) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cell. *Blood* 110: 735-742

Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Bilim VN, Smyrk TC, Chari ST, Billadeau DD (2006) Abberant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clin Cancer Res* 12: 5075-5081

Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD (2005) Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 65:2076-2081.

Parker SL, Long T, Bolden S, Wingo PA (1997) Cancer statistics, 1997. *C A Cancer J Clin* 47: 5-27

Patel S, Woodgett JR (2008) Glycogen Synthase Kinase-3 and Cancer: Good Cop, Bad Cop? *Cancer Cell* 14: 351-353

Polakis P (2007) The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17: 45-51

Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of immunology*. 15: 707-747.

Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP (2008) Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 28: 7168-7181

Rosewicz S, Wiedenmann B (1997) Pancreatic carcinoma. *Lancet* 349: 485-489

Sakorafas GH, Tsiotou, AG, Tsiotou, GG (2000) Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer treatment reviews* 26: 29-52

Scholz A, Heinze S, Detjen KM, Peters M, Welzel M, Hauff P, Schirner M, Wiedenmann B, Rosewicz S (2003) Activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) supports the malignant phenotype of human pancreatic cancer. *Gastroenterology* 125: 891-905

Schulz RA, Yutzey KE (2004) Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol* 266: 1-16

Shakoori A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, Kawakami K, Minamoto T (2007) Inhibition of GSK-3 β activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci* 98:1388-1393

ShakooriA, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, Mai M, Takahashi Y, Minamoto T (2005) Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005: 334:1365-1373

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241: 202-205

Sherr CJ (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73: 1059–1065

Singh G, Singh SK, König A, Reutlinger K, Nye MD, Adhikary T, Eilers M, Gress TM, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010) Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF- β switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 285: 27241-27250

Sitara D, Aliprantis AO (2010) Transcriptional regulation of bone and joint remodeling by NFAT. *Immunol Rev* 233: 286-300

Szuhai K, Ijszenga M, de Jong D, Karseladze A, Tanke HJ, Hogendoorn PC (2009) The NFATc2 gene is involved in a novel cloned translocation in a Ewing

sarcoma variant that couples its function in immunology to oncology. Clin Cancer Res 15: 2259-2268

Takada Y, Fang X, Jamaluddin MS, Boyd DD, Aggarwal BB (2004) Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3 β abrogates activation of I κ B α kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by TNF. J Biol Chem 279:39541–54

Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 3801-3804

Taniguchi S, Iwamura T, Katsuki T (1992) Correlation between spontaneous metastatic potential and type I collagenolytic activity in a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) and sublines. Clin Exp Metastasis 10: 259-266

Tanji C, Yamamoto H, Yorioka N, Kohno N, Kikuchi K, Kikuchi A (2002) A-kinase anchoring protein AKAP220 binds to glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and mediates protein kinase A-dependent inhibition of GSK-3 β . J Biol Chem 277: 36955-36961

Velupillai P, Sung CK, Tian Y, Dahl J, Carroll J, Bronson R, Benjamin T (2010) Polyoma virus-induced osteosarcomas in inbred strains of mice: host determinants of metastasis. PLoS Pathog 6: e1000733

Vilá MR, Lloreta J, Schüssler MH, Berrozpe G, Welt S, Real FX (1995) New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. Lab Invest 72: 395-404

Wang Z, Iwasaki M, Ficara F, Lin C, Matheny C, Wong SH, Smith KS, Cleary ML (2010) GSK-3 promotes conditional association of CREB and its coactivators with MEIS1 to facilitate HOX-mediated transcription and oncogenesis. Cancer Cell 17: 597-608

Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somervaille TCP, Cleary ML, (2008) Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukemia maintenance and targeted therapy. Nature 455: 1205-1209

Watanabe I, Hasebe T, Sasaki S, et al. (2003) Advanced pancreatic ductal cancer: fibrotic focus and β -catenin expression correlate with outcome. *Pancreas* 26: 326–33

Wei W, Jin J, Schlisio S, Harper JW, Kaelin WG (2005) The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 8: 25-33

Wilson W 3rd, Baldwin AS (2008) Maintenance of constitutive IkappaB kinase activity by glycogen synthase kinase-3alpha/beta in pancreatic cancer. *Cancer Res* 68: 8156-8163

Wong HH, Lemoine NR (2009) Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6: 412-422

Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9: 2431-2438

Woodgett JR, Cohen P (1984) Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochem. Biophys. Acta* 788: 339-347.

Xie K, Wei D, Huang S (2006) Transcriptional anti-angiogenesis therapy of human pancreatic cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:147-156

Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, Stark GR (2005) Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 65: 939-947

Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR (2007) Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev* 21: 1396-1408

Yang J, Stark GR (2008) Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* 18: 443-451

Yoeli-Lerner M, Chin YR, Hansen CK, Toker A (2009) Akt/protein kinase b and glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway regulates cell migration through the NFAT1 transcription factor. *Mol Cancer Res* 7: 425-432

Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A (2005) Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 20: 539-550

Yu CL, Meyer DJ, Campell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R (1995) Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269: 81-83

Yu H, Kortylewski M, Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immuno* 7:41-51

Yuan H, Mao J, Li L, Wu D (1999) Suppression of glycogen synthase kinase activity is not sufficient for leukemia enhancer factor-1 activation. *J Biol Chem* 274: 30419-30423

Zhang Y, Bharadwaj U, Logsdon CD, Chen C, Yao Q, Li M (2010) ZIP4 regulates pancreatic cancer cell growth by activating IL-6/STAT3 pathway through zinc finger transcription factor CREB. *Clin Cancer Res* 16:1423-1430

Zhu Q, Yang J, Han S, Liu J, Holzbeierlein J, Thrasher JB, Li B (2010) Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer in vivo. *Prostate*. 2010 Oct 28. [Epub ahead of print]

7 Anhang

7.1 *Abbildungs- und Tabellenverzeichnis*

Abbildung 1: Die komplexen und miteinander verbundenen Zellsignalwege, die an der Pankreaskarzinogenese beteiligt sind	2
Abbildung 2: GSK-3-Substrate	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der GSK- α und GSK-3 β -Isoformen aus Säugetieren	5
Abbildung 4: Regulation der GSK-3 β -Aktivität	7
Abbildung 5: Primärstruktur von NFAT-Transkriptionsfaktoren	11
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Calcineurin/NFAT-Signalweges ...	13
Abbildung 7: Auswirkungen einer pharmakologischen GSK-3 β -Hemmung auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien PaTu8988t und IMIM-PC1.....	43
Abbildung 8: Auswirkungen einer genetischen GSK-3 β -Depletion auf die Zellproliferation.....	44
Abbildung 9: GSK-3 β -abhängige Expression des G1-Zellzyklusregulators Cyclin D1	45
Abbildung 10: Tumorzellwachstum im Xenograftmodell nach pharmakologischer GSK-3 β -Inhibition.....	46
Abbildung 11: Immunhistologische Färbung der IMIM-PC1-Tumorgewebe	48
Abbildung 12: Endogene Expression von NFATc2 in verschiedenen Pankreaskarzinomzellen	49
Abbildung 13: Immunhistologischer Nachweis von NFATc2 in humanen Pankreasgeweben	50
Abbildung 14: NFATc2-abhängige Proliferation von Pankreaskarzinomzellen	50

Abbildung 15: Funktionelle Auswirkungen einer stabilen NFATc2-Überexpression in Pankreaskarzinomzellen	51
Abbildung 16: NFATc2-abhängige Regulation von Zellzyklusregulatoren	52
Abbildung 17: Analyse der NFATc2 und GSK-3 β -Lokalisation in Pankreaskarzinomzellen	53
Abbildung 18: Luciferase-Reportergenassays zur Analyse der GSK-3 β -abhängigen NFATc2-Transaktivierung.....	54
Abbildung 19: Expressionsanalyse von NFATc2 nach GSK-3 β -Inaktivierung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	55
Abbildung 20: Subzelluläre Fraktionierung zur Lokalisierung des GSK-3 β -vermittelten Expressionsverlustes von NFATc2	56
Abbildung 21: Stabilitätsassay nach GSK-3 β -Depletion	57
Abbildung 22: Identifikation von GSK-3 β -Phosphorylierungsstellen	59
Abbildung 23: Immunhistologische Färbung der IMIM-PC1-Xenograftgewebe auf p-NFATc2	60
Abbildung 24: Charakterisierung der Bedeutung der SP2-Phosphorylierung für die Stabilität von NFATc2.....	61
Abbildung 25: Immunfluoreszenzanalysen nach CHX-Behandlung	62
Abbildung 26: Die Dephosphorylierung der SP2-Domäne geht mit einem verstärkten proteosomalen Abbau von NFATc2 einher.....	63
Abbildung 27: Die konstitutive Phosphorylierung der SP2-Domäne bewirkt eine Resistenz gegen den GSK-3 β -vermittelten Abbau	64
Abbildung 28: Nukleäre Expression von NFATc2 nach AR-A-Behandlung.....	64
Abbildung 29: Immunhistologische Analyse der p-NFATc2 ^{SP2} -Lokalisation.....	65
Abbildung 30: Funktionelle Auswirkung der konstitutiven NFATc2-Phosphorylierung an der SP2-Region.....	66

Abbildung 31: Wachstumsverhalten von stabil transfizierten Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	67
Abbildung 32: Proliferation von Pankreaskarzinomzellen mit stabiler Expression der NFATc2-Konstrukte nach AR-A-Behandlung	68
Abbildung 33: Analyse der GSK-3 β -abhängigen transkriptionellen Aktivität der verschiedenen NFATc2-Konstrukte	69
Abbildung 34: Co-Lokalisationsstudien in humanen Pankreastumorgeweben	70
Abbildung 35: Analyse der NFATc2-STAT3-Interaktion	71
Abbildung 36: Analyse der NFATc2-Interaktionspartner im Zellkern.....	72
Abbildung 37: DNA-Pulldownassay zur Demonstration einer NFATc2- STAT3-Kooperation an der DNA.....	72
Abbildung 38: GSK-3 β -Abhängigkeit der STAT3-NFATc2-Interaktion im Zellkern	73
Abbildung 39: Analyse der funktionellen NFATc2-STAT3-Interaktion.....	74
Abbildung 40: Luciferase-Reporterassay zur Darstellung der NFATc2- Aktivierung nach Überexpression verschiedener STAT3- Expressionskonstrukte	75
Abbildung 41: Analyse der STAT3-Abhängigkeit der funktionellen NFATc2- GSK-3 β -Kooperation	75
Abbildung 42: Proliferationsassay nach genetischem STAT3- <i>knockdown</i>	76
Abbildung 43: BrdU-Proliferationsassay nach genetischem STAT3- <i>knockdown</i>	77
Abbildung 44: Proliferationsassay nach STAT3- <i>knockdown</i> und pharmakologischer GSK-3 β -Hemmung	78
Abbildung 45: Vereinfachtes Modell der kanonischen STAT- Signaltransduktionskaskade.....	85

Abbildung 46: Aktuelles Modell der GSK-3 β -vermittelten Regulation des NFAT-Metabolismus	89
--	----

Tabelle 1: Übersicht über die duale Rolle von GSK-3 β in gastro- intestinalen Karzinomen (modifiziert nach Mishra, 2010)	9
---	---

7.2 Abkürzungsverzeichnis

APC	„adenomatous polyposis coli“
APS	Ammoniumpersulfat
AR-A	AR-014418
Bcl-2/Bcl-XL	B-cell lymphoma 2 und XL (apoptosesteuernde Proteine)
BSA	Bovines Serum Albumin
c.a.	„constitutive active“
CAM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
cDNA	Komplementäre DNA
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CHX	Cycloheximid
CK 1	Caseinkinase I
CK 2	Caseinkinase 2
COX	Cyclooxygenase
COX2	Cyclooxygenase 2
CRAC	„Ca ²⁺ release activated channels“
CREB	cAMP response element-binding protein
CsA	Cyclosporin A
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
dNTPs	Desoxyribonucleosid-Triphosphate
DSCR1	<i>„down syndrome candidate region 1“</i>
DTT	Dithiothreitol
DYRK	<i>„dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated-kinase“</i>
ECL	<i>„enhanced chemiluminescence“</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)tetraessigsäure
ESC	Embryonische Stammzellen
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötales Kälberserum
GS	Glykogensynthase
GSK-3 α	Glykogen-Synthase-Kinase-3 alpha
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3 beta
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HOX	<i>„homebox“</i>
HP1- γ	Heterochromatinprotein 1-gamma
HRP	<i>„horse radish peroxidase“</i>
hTERT	Humane Telomerase reverse Transkriptase
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor

IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IP	Immunpräzipitation
JAK	Janus-Kinase
JNK	Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEF-1	„ <i>leukemia enhancer factor-1</i> “
Luc	Luciferase
miRNA	microRNA
MMP-2	Matrix-metalloproteinase 2
mRNA	Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₄ P ₂ O ₇	Tetranatriumdiphosphat
NC	Nitrocellulose
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NHR	NFAT-homologe Region
P	Phosphoryliert
PanIN	Pankreatisch-intraepitheliale Neoplasie
PCR	Polymerasekettenreaktion

PFA	Paraformaldehyd
PGDF	<i>„platelet-derived growth factor“</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2A
RHD	REL-homologe Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
siRNA	<i>„small interfering RNA“</i>
SP	Serin-Prolin-Phosphorylierungsmotive
SRR1	Serin-reiche Region 1
STAT3	<i>„signal transducer and activator of transcription 3“</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBST	<i>„tris-buffered Saline Tween®20“</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF α , TGF β	<i>„transforming growth factors α und β“</i>

TNF- α	Tumonekrosefaktor-alpha
TonEBP	tonicity element binding protein
Tris	Trishydroxylmethylaminomethan
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween®20	Polyoxyetylen sorbitan monolaurat
Tyr	Tyrosin
U-STAT	Unphosphoryliertes STAT
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
β -TrCP	<i>„beta-transducin repeat containing protein“</i>
XIAP	<i>„X-linked inhibitor of apoptosis protein“</i>

7.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Gießen waren die folgenden Damen und Herren:

Becker, Boland, Boll, Borsch, Bräunig, Brückner, Eichelberg, Erhardt, Gauly, Hauenschild, Herrmann, Hoffmann, Honermeyer, Irmner, Kämpfer, Katz, Köhler, Krawinkel, Kühl, Kuntz, Kunz, Leonhäuser, Liebchen, Liersch, Linn, Lührmann, Meier-Gräwe, Mersch-Sundermann, Neuhäuser-Berthold, Pätzold, Rahlfs, Schachtel, Schlich, Schmitz, Schnell, Schubert, Schulz, Stein, Wächtershäuser, Wenisch, Wenzel

7.4 Danksagung

Mein herzlicher und aufrichtiger Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder für die Möglichkeit, ein interessantes Thema in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Mit seiner herausragenden sozialen und fachlichen Kompetenz konnte er die Motivation für die Forschung meistens auf einem maximalen Level sowie Zweifel auf einem minimalen Level halten. Vor allem konnte er immer interessante Diskussionen, bzw. Fragen aufwerfen und aufnehmen. Auf seine humorvolle und offene Art konnte er die Atmosphäre in der Arbeitsgruppe stets angenehm gestalten. Danke für die Hilfe in allen Belangen, konstruktiven Input, aufbauende und ehrliche Worte und vor allem dafür, dass er immer das Gefühl vermittelt hat, an der richtigen Stelle zu sein und seinen Weg gefunden zu haben. Durch ihn entwickelte und behielt ich Begeisterung und Talent für die Wissenschaft!

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gress, dass ich meine Arbeit in der Abteilung Gastroenterologie anfertigen durfte.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. German Horn, Gabriel Lacourt und Gabriele Lang für eine nette und angenehme Zeit in der AG Horn bedanken, auf welche ich gerne zurückblicke.

Meinen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe, Dr. Alexander und Dr. Ute König, Dr. Thomas Linhart, Dr. Malte Buchholz und Bettina Geisel möchte ich mich sehr für eine gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe mit Rat und Tat bedanken. Ebenso danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Michl und Buchholz für die nette Laboratmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank geht an Kristina Reutlinger, Elisabeth Glesel sowie Dr. Shiv und Dr. Garima Singh. Bei Dr. Shiv Singh bedanke ich mich für die gute Kooperation während unseren Projekten, für lange Diskussionen, gegenseitiges Motivieren und eine humorvolle und besondere Art der Zusammenarbeit und Freundschaft. Bei Dr. Garima Singh, Kristina Reutlinger und Elisabeth Glesel möchte ich mich für die Gestaltung eines netten und heiteren Laboralltages bedanken, sowie für das freundschaftliche Verhältnis, das daraus entstanden ist. Danke für manch lustige private Unternehmungen, für experimentelle und mentale Unterstützung und Ideen, sowie für unsere

gemeinsamen Unterhaltungen und Diskussionen, in denen immer viel gelacht wurde!

Meiner Freundin Dr. Bettina Kaminski danke ich dafür, dass sie während meiner Promotion stets ein offenes Ohr für ernste und heitere Geschichten sowie Probleme aus dem Laboralltag hatte und mir dadurch eine riesige Unterstützung war. Danke, dass wir diese Erfahrung miteinander geteilt haben.

Meinen Eltern Katarina und Maksa Dobes und ganz besonders meiner Schwester Dijana Dobes danke ich für die liebevolle Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin.

Mein größter Dank gilt dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, Björn Baumgart. Durch die Kraft und die Ruhe, die er mir stets während kritischen und schwierigen Phasen vermittelte, fühlte ich mich bedingungslos unterstützt und gestärkt. Danke für deine Liebe und Geduld, und dass mit dir die Welt immer in Ordnung ist.